

Aruana Fagundes Fiuza Hansel

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE DOCK11 (FATOR
DE TROCA DE NUCLEOTÍDEO GUANINA) EM
TUMORES**

Trabalho de Conclusão de
Curso submetido ao Curso de
Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina
como requisito obrigatório
para a obtenção do Grau de
Licenciada em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Dr^a Patricia
Dillenburg Pilla

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora, através
do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC

Hansel, Aruana Fagundes Fiuza

Estudo da participação de DOCK11 (fator de troca de nucleotídeo Guanina) em tumores / Aruana Fagundes Fiuza Hansel ; orientadora, Patricia Dillenburg Pilla, 2017. 57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Metástase. 3. CXCR4. 4. Pequenas Proteínas G. 5. GEF. I. Dillenburg Pilla, Patricia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Dedico este trabalho a Deus, à minha amada família e ao meu amor, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela Sua presença em minha vida e pelas forças e graças em todas as ocasiões, e a Jesus Cristo, por ser o meu grande exemplo de Vida e Amor.

Sou intensamente grata à minha mãe Sinara e meu pai Fabricio, à minha irmã Melissa, ao meu irmão Augusto e ao meu cachorro Ozzy, por me amarem e apoiarem incondicionalmente, cada um a seu mais adorável modo.

Também agradeço do fundo do meu coração pelo amor e carinho do meu amor, Luciano, que me ajudou e motivou a continuar seguindo meus sonhos e a não desistir durante a minha trajetória.

Gostaria de agradecer a todas as amigas e todos os amigos que proporcionaram alegrias e auxílio durante todo o período de faculdade e além.

Agradeço a toda a equipe de laboratório do LACERT pelo aprendizado e pelas novas amizades que me proporcionaram através da minha Iniciação Científica.

Agradeço imensamente à UFSC por ter sido uma ótima Universidade e ao CNPQ, por ter financiado meu trabalho durante a Iniciação Científica e por ter custeado meus estudos pelo programa “Ciências Sem Fronteiras”, pois isso proporcionou uma experiência incrível e fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

Por fim, deixo aqui meus sinceros agradecimentos e pensamentos à Henrietta Lacks, mulher negra americana que foi a progenitora, sem seu consentimento nem conhecimento, da linhagem celular HeLa utilizada durante minha pesquisa e em muitas outras no meio científico. Que possamos honrar sua história através da construção de uma ciência mais humana e respeitosa à Vida.

“I did not want to just know names of things. I remember really wanting to know how it all worked.”

(Elizabeth Blackburn)

RESUMO

Câncer compreende várias doenças causadas pela proliferação incontrolável de células anormais que originam tumores capazes de invadir tecidos, podendo se disseminar pelo corpo e colonizar outros órgãos num processo chamado de metástase. A metástase é a maior causadora de mortes relacionadas ao câncer e ainda não existem terapias efetivas para tratá-la. Uma etapa crucial durante o processo metastático é a migração direcional, ou quimiotaxia, das células tumorais em direção a gradientes de concentração de quimioatrativos. Quimioatrativos podem ser secretados constantemente no organismo para manter a homeostase do indivíduo, como o fator SDF-1. Junto com seu receptor CXCR4, regulam vias de sinalização relacionadas à migração direcional, como a manutenção de células-tronco da medula óssea. Contudo, esse eixo SDF-1/CXCR4 foi observado induzindo metástase, pois a secreção natural do fator nos órgãos também atrai as células tumorais que expressam o seu receptor. Infelizmente, a utilização de fármacos antagonistas à CXCR4 não é uma opção para tratar esse tipo de metástase, pois a inibição do receptor resulta na evasão das células-tronco da medula óssea, evidenciando a necessidade de mais pesquisas sobre novos alvos farmacológicos. Uma estratégia é procurar possíveis alvos mais abaixo da via de sinalização desse eixo: sendo CXCR4 um receptor acoplado a proteínas G (GPCR), sua ativação induz cascatas de sinalização de Pequenas Proteínas G (GTPases), as quais regulam a polimerização e despolimerização de filamentos de actina, essencial para a modulação do citoesqueleto e consequentemente para migração celular. Para serem ativadas, as Pequenas Proteínas G necessitam do auxílio de fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEF). O mesmo grupo dessa pesquisa realizou em estudos independentes anteriores uma biblioteca de pequenos RNAs de interferência (siRNA, do inglês “Small Interfering RNA”) para diminuir a expressão de 80 GEFs diferentes, antes da migração das

células tumorais em direção a um gradiente de concentração de SDF-1. Os dados, ainda não publicados pelo grupo, mostraram que a diminuição da expressão do GEF DOCK11 resultou em uma menor taxa de migração das células em direção ao quimioatrativo SDF-1, o que propõe seu papel importante na migração direcional. Dessa forma, DOCK11 foi selecionado como alvo de estudos nessa pesquisa. O objetivo geral desse trabalho é estudar a contribuição de DOCK11 na migração de células tumorais da linhagem HeLa e em metástase de pacientes, investigando a hipótese de que DOCK11 é importante para a migração e também participa da mesma via de sinalização de CXCR4 e SDF-1 para quimiotaxia. Através da realização de experimentos de fechamento de ferida *in vitro* e ensaio de migração, observou-se que a menor expressão de DOCK11 não alterou a capacidade de migração randômica das células. Por isso, pudemos concluir que DOCK11 não é importante para a migração randômica de células tumorais HeLa. Para investigar a hipótese de que DOCK11 participa da mesma via de CXCR4 em câncer de mama, foram feitas análises de bioinformática em tumores de pacientes. Os resultados mostraram a maior modulação da expressão de DOCK11 em tumores mamários metastáticos e invasivos, além de estar acompanhando o padrão de alta expressão de CXCR4 nos mesmos casos. Assim pudemos concluir que a modulação da expressão de DOCK11 está mais acentuada em tumores mamários invasivos junto com CXCR4, corroborando para a existência de uma via de sinalização com ambos os genes para realização de metástase nesse tipo de câncer. Portanto, essa pesquisa tem potencial translacional para a elaboração de novos fármacos com DOCK11 como alvo, para o tratamento de câncer de mama invasivo e metastático que utilize a via de sinalização de DOCK11 e CXCR4 para realizar a migração direcional.

Palavras-chave: Câncer; Metástase; Migração direcional; Pequenas Proteínas G; CXCR4; SDF-1; CXCL12.

ABSTRACT

Cancer comprehends a diversity of diseases caused by the uncontrollable proliferation of abnormal cells that origin tumours, which can disseminate through the body and colonize other organs in a process called metastasis. Metastasis is the major cause of deaths related to cancer and there still does not exist effective therapies for treating it. A crucial step during the metastatic process is the directional migration, or chemotaxis, of the tumour cells towards chemoattractant concentration gradients. Chemoattractant can be secreted constantly in the organism to maintain the individual's homeostasis, such as factor SDF-1. Together with its receptor CXCR4, they regulate signalling pathways related to directional migration, such as the maintenance of stem cells of bone marrow. However, this axis SDF-1/CXCR4 was observed inducing metastasis, since the natural secretion of the factor in the organs also attracts the tumour cells that express its receptor. Unfortunately, the use of CXCR4 antagonists' drugs is not an option to treat this kind of metastasis, since the receptor's inhibition results in the evasion of stem cells from the bone marrow, evidencing the necessity of more research about new pharmacological targets. One strategy is to search for possible targets further down the signalling pathway of this axis: being CXCR4 a G-protein coupled receptor (GPCR), its activation induces signalling cascades of small G proteins (GTPases), which regulate the polymerization and depolymerisation of actin filaments, essential for the modulation of the cytoskeleton and consequently for cellular migration. To be activated, small G proteins needs the help of guanine exchange factors (GEF). The same group of this research realized in independent previous studies a screening using small interfering RNAs (siRNAs) library to decrease the expression of 80 different GEFs, before the migration of the tumour cells towards a concentration gradient of SDF-1. The data, still unpublished by the group, showed that the decrease of expression of GEF

DOCK11 resulted in a smaller migration rate of the cells towards the chemoattractant SDF-1, which proposes its important role in directional migration. Thus, DOCK11 was selected as a study target in this research. The main objective of this work is to study the contribution of DOCK11 in the migration of tumoral cells of HeLa lineage and in patients' metastasis, investigating the hypothesis that DOCK11 is important for migration and also participates in the same signalling pathway of CXCR4 and SDF-1 for chemotaxis. Through the performance of *in vitro* wound healing and migration experiments in this work, it was observed that the lower expression of DOCK11 does not alter the cells' capacity of random migration. Therefore, we can conclude that DOCK11 is not important for random migration in tumour HeLa cells. To investigate the hypothesis that DOCK11 participate in the same signalling pathway of CXCR4 in breast cancer, bioinformatic analysis in patients' tumours were made. The results showed higher expression of DOCK11 in metastatic and invasive mammary tumours, as well as a very similar pattern of expression between DOCK11 and CXCR4. In this manner we can conclude that the modulation of DOCK11 expression is more pronounced in invasive mammary tumours together with CXCR4, corroborating for the existence of a signalling pathway with both genes for the realization on metastasis in this type of cancer. Therefore, this research has translational potential for the elaboration of new drugs with DOCK11 as a target, for the treatment of invasive and metastatic breast cancer that uses the signalling pathway of DOCK11 and CXCR4 to perform directional migration.

Keywords: Cancer; Metastasis; Directional migration; Small G proteins; CXCR4; SDF-1; CXCL12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Passos interdependentes durante o processo metastático	17
Figura 2: Esquema da ativação e inativação de proteínas G por fatores GEF e GAP, respectivamente. O fator GEF ativa a proteína G ao trocar GDP por GTP, e o fator GAP inativa a proteína G ao estimular a hidrólise de GTP à GDP.	23
Figura 3: Captura de tela do site Oncomine mostrando: A) os filtros escolhidos para pesquisa dentre os filtros primários (do inglês, “Filter” e “Primary Filters”, respectivamente); B) conjuntos de dados disponíveis para análise (do inglês, “Datasets”); C) seleção do estudo “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003); D) visualização detalhada do conjunto de dados (do inglês, “Dataset detail”); E) agrupamento das amostras por estágio M (do inglês, “Group by: M Stage”); F) visualização do gráfico em boxplot.	39
Figura 4: Captura de tela da plataforma livre Oncomine destacando a visualização da modulação da expressão de DOCK11 e variados genes da via de sinalização de CXCR4, no conjunto de dados “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007), agrupado por tipo de câncer e comparado com tecido normal.	41
Figura 5: Captura de tela da plataforma livre Oncomine destacando: A) a ordem dos estudos por valor de P em superexpressão; B) seleção para comparação simultânea dos conjuntos de dados “Karnoub Breast”, “Radvanyi et al” e “Zhao et al” (KARNOUB et al., 2007; RADVANYI et al., 2005; ZHAO et al., 2004); C) modulação da expressão de DOCK11 e genes da via de sinalização de CXCR4.	43
Figura 6: Fotografias de microscopia de contraste de fase mostrando a morfologia de células da linhagem HeLa 48 horas após a transfecção com siRNA Controle e DOCK11. Escala de 100 µM.	44

Figura 8: Fotografias da padronização da concentração do inibidor de proliferação celular, Mitomicina C. Escala de 200 μm 46

Figura 9: Gráfico da quantidade de RNAm de DOCK11 em células da linhagem HeLa transfectadas com siRNA Controle e DOCK11. N amostral de 6 em duplicata técnica. $P < 0,01$ 47

Figura 10: Gráfico da porcentagem de fechamento da ferida *in vitro* em 48 horas após a transfecção de siRNA DOCK11 e Controle. Fotos representativas de cada coluna em escala de 100 μm . N amostral de 3 experimentos independentes em triplicata. $P = 0,1023$ 48

Figura 11: Gráfico da porcentagem do ensaio de migração em 48 horas após a transfecção de siRNA e com inibidor de proliferação Mitomicina C. Fotos representativas de cada coluna em escala de 100 μm . N amostral de 3 experimentos independentes em triplicata. $P = 0,2586$ 49

Figura 12: Gráfico da plataforma Oncomine mostrando a expressão de DOCK11 nos dados de “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003) comparando tecido saudável com câncer de mama sem metástase, e tumoral com metástase. Razão da expressão centrada na mediana em \log^2 , limiar de $p < 0,0001$. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de pacientes em cada um. 51

Figura 13: Gráfico da plataforma Oncomine mostrando a expressão de DOCK11 em carcinoma ductal de mama em “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003), comparando tecido saudável com tumoral sem metástase, e tumoral com metástase. Razão da expressão centrada na mediana em \log^2 , limiar de $p < 0,001$. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de pacientes em cada um. 52

Figura 14: Gráfico da plataforma Oncomine mostrando a expressão de DOCK11 em “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012), comparando tecido saudável com tumoral sem invasão linfática, com invasão linfática moderada e com invasão linfática severa. Intensidade da expressão centrada na mediana em \log^2 , limiar de $p < 0,0001$.

Valores abaixo de cada grupo indicam o número de pacientes em cada um. 53

Figura 15: Imagem da plataforma Oncomine mostrando a expressão de CXCR4 e DOCK11 em carcinoma ductal invasivo de mama e tecido normal em “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007). A diferença de cor das células indica a maior ou menor expressão do gene, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene se encontra na lista dos 1%, 5% ou 10% genes mais modulados. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de amostras..... 54

Figura 16: Imagem da plataforma Oncomine mostrando a expressão de CXCR4 e DOCK11 em tumores de “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012) agrupados pelo grau de invasão linfática (ausente, moderada ou intensa). A diferença de cor das células indica a maior ou menor expressão do gene, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene se encontra na lista dos 1%, 5% ou 10% genes mais modulados. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de amostras. 55

Figura 17: Imagem da plataforma Oncomine mostrando a expressão de CXCR4 e DOCK11 em quatro estudos diferentes comparando entre tecido normal e cancerígeno, dos tipos 1) estroma de carcinoma ductal invasivo de mama (KARNOUB et al., 2007), 2) carcinoma ductal invasivo de mama *in situ* (RADVANYI et al., 2005), 3) carcinoma ductal invasivo de mama (ZHAO et al., 2004) e 4) carcinoma lobular de mama (ZHAO et al., 2004). A diferença de cor das células indica a maior ou menor expressão do gene, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene se encontra na lista dos top 1%, 5% ou 10% dos genes modulados. Valores abaixo de cada coluna indicam o número do estudo..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cdc42 – Família de RhoGTPases (do inglês, “Cell Division Control Protein 42 Homolog”)

cDNA – DNA complementar

CT – Ciclo Limiar (do inglês “Threshold Cycle”)

CXCL12 – Químioatrativo, sinônimo de SDF-1 (do inglês, “C-X-C motif chemokine 12”)

CXCR4 – Receptor do tipo GPCR (Motivo C-X-C de Receptor de Quimiocina, ou do inglês, “C-X-C Motif Chemokine Receptor 4”)

DMEM – Meio de cultura (Meio de Eagle Modificado Por Dulbecco, ou do inglês, “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DOCK11 – Fator ativador de Pequenas Proteínas G, ou GEF (Dedicador de Citocinese 11, ou do inglês, “Dedicator Of Cytokinesis 11”)

ER – Receptor de Estrogênio

GAP – Fator inibidor de Pequenas Proteínas G (Proteínas Ativadoras de GTPase, ou do inglês, “GTPase-Activating Proteins”)

GAPDH – Gene de referência, do inglês, “house keeping gene” (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, ou do inglês, “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”)

GEF – Ativadores de Pequenas Proteínas G (Fatores de Troca de Nucleotídeo Guanina, do inglês, “Guanine Nucleotide Exchange Factors”)

GPCR – Receptor Acoplado à Proteína G (do inglês, “G-Protein coupled receptor”)

GDP – Guanosina Difosfato (do inglês, “guanosine diphosphate”)

GTP – Guanosina Trifosfato (do inglês, “guanosine-5’-triphosphate”)

HeLa – Linhagem celular tumoral de câncer de colo de útero, referência à Henrietta Lacks

NIH – Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, “Polymerase Chain Reaction”)

PR – Receptor de Progesterona

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – Ácido Ribonucleico (RNA) Mensageiro

SDF-1 – Químioatrativo, sinônimo de CXCL12 (do inglês “stromal cell-derived factor-1”)

SFB – Suplementação de meio de cultura, Soro Fetal Bovino

siRNA – Pequeno Ácido Ribonucleico de Interferência (do inglês “Small Interfering Ribonucleic Acid”)

WT – do inglês, “Wild Type”, caráter Selvagem não alterado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 CÂNCER	15
1.2 METÁSTASE	15
1.3 METÁSTASE E MIGRAÇÃO DIRECIONAL.....	18
1.4 O EIXO CXCR4/SDF-1 E SUA RELAÇÃO COM CÂNCER	18
1.5 PROTEÍNAS G E PEQUENAS PROTEÍNAS G	22
1.6 JUSTIFICATIVA.....	26
1.7.1 Objetivo Geral.....	28
1.7.2 Objetivos Específicos	28
2 METODOLOGIA	29
2.1 CULTURA CELULAR	29
2.2 TRANSFEÇÃO DE siRNA	29
2.3 EXTRAÇÃO DE RNA	29
2.4 TRATAMENTO COM DNASE.....	30
2.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA	30
2.6 PCR	31
2.7 PCR EM TEMPO REAL	32
2.8 TRATAMENTO COM MITOMICINA C.....	33
2.9 FECHAMENTO DE FERIDA <i>IN VITRO</i>	33
2.10 ENSAIO DE MIGRAÇÃO	35
2.11 MICROSCOPIA	36
2.12 ESTATÍSTICA	36
2.13 BIOINFORMÁTICA	37
3 RESULTADOS.....	44

3.1 MENOR EXPRESSÃO DE DOCK11 E MORFOLOGIA CELULAR NORMAL APÓS TRANSFEÇÃO DE siRNA	44
3.2 MIGRAÇÃO RANDÔMICA DE HeLa APÓS TRANSFEÇÃO DE siRNA	47
3.3 EXPRESSÃO DE DOCK11 EM TUMORES DE MAMA INVASIVOS E METASTÁTICOS	50
3.4 EXPRESSÃO DE CXCR4 É ACOMPANHADA PELA EXPRESSÃO DE DOCK11 EM TUMORES DE MAMA	53
4 DISCUSSÃO	57
4.1 INFLUÊNCIA DE DOCK11 NA MIGRAÇÃO CELULAR RANDÔMICA	57
4.2 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DOCK11 EM TUMORES	59
4.3 PADRÃO DE EXPRESSÃO DE DOCK11 E CXCR4	61
4.4 CONCLUSÃO	63
5 PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças relacionadas à proliferação incontrolável de células anormais que formam massas celulares chamadas de tumores. O câncer pode surgir em diferentes locais do corpo, o que definirá o seu tipo tumoral mais específico, como por exemplo, câncer de medula óssea ou de rins. O Instituto Nacional de Câncer estimou quase 600 mil novos casos no Brasil, com mais de 60 mil de câncer de próstata, mais de 58 mil de câncer de mama e mais de 28 mil novos casos de câncer do sistema respiratório (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil), 2017).

Nem todos os tumores são classificados como câncer, pois serão definidos como benignos ou malignos dependendo de sua capacidade de invasão do tecido. Os tumores benignos são massas celulares anormais restritas que não invadiram o tecido adjacente, podendo ser hiperplasia (quando o número de células aumenta, mas a morfologia celular está normal) ou displasia (quando as células se tornam anormais, mas permanecem restritas ao seu tecido). No momento em que as células anormais invadem o tecido ao redor, dá-se o nome de tumor maligno ou câncer. Massas benignas podem se tornar malignas ou não, visto que isso depende de múltiplos fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo: resumidamente do seu genótipo mais a influência do ambiente. Somente os tumores considerados malignos que podem se espalhar, invadir tecidos e colonizar outros órgãos, em um processo chamado de metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTE (EUA), 2017).

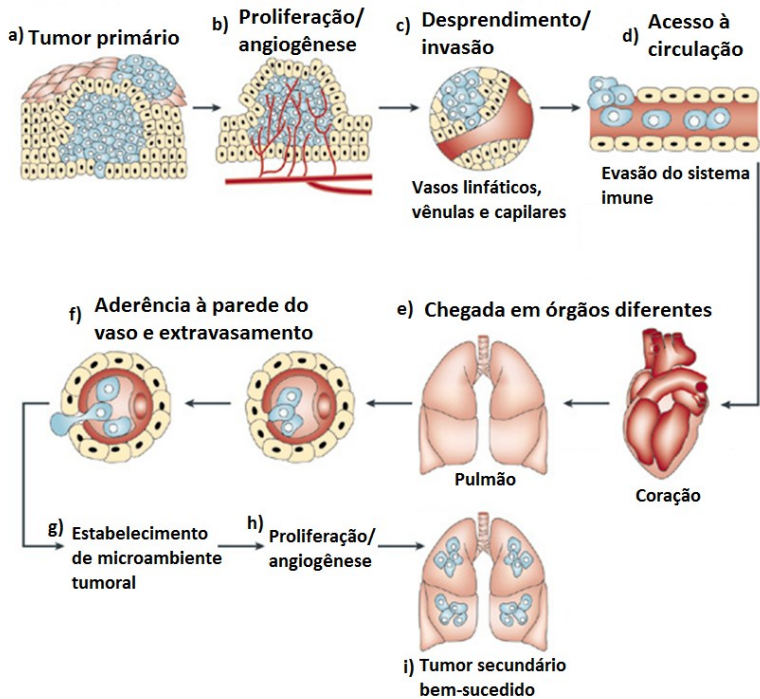
1.2 METÁSTASE

Quando um tumor maligno invade o tecido adjacente e suas células conseguem colonizar outro órgão,

formando um novo tumor secundário, dá-se o nome de metástase, processo que está ligado a cerca de 90% das mortes relacionadas ao câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; FIDLER E KRIPKE, 2015; ECKHARDT et al., 2012).

A metástase consiste de um longo processo com várias etapas as quais as células tumorais deverão realizar, sempre evadindo o sistema imune e sobrevivendo à defesa imunológica do paciente, até conseguirem colonizar outro tecido e formar um novo foco tumoral (Figura 1) (FIDLER E KRIPKE, 2015; FIDLER, 2003; CHAMBERS, GROOM, MACDONALD, 2002). Primeiramente, as células tumorais necessitam de acesso à circulação sanguínea ou linfática pela irrigação da massa tumoral ou também proporcionada pela angiogênese, a formação de novos vasos sanguíneos (NAGY, DVORAK, 2012; FIDLER, 2002). Ao se desprenderem da massa tumoral e ganharem acesso à corrente sanguínea ou linfática, as células tumorais são transportadas pelo corpo através do fluxo sanguíneo ou linfático, podendo não sobreviver a esse evento pela ação do sistema imune (FIDLER, 2003). As sobreviventes podem ficar aderidas aos capilares de órgãos e locais diferentes do tumor primário, em células endoteliais ou na membrana basal (FIDLER, 2003). Após a adesão, ocorre a migração da célula tumoral, extravasando para fora do vaso sanguíneo e atingindo o tecido adjacente. Finalmente, a célula tumoral poderá se instalar no novo tecido, estabelecendo um novo microambiente tumoral para sua manutenção, sobrevivência, proliferação e angiogênese, para a formação de um tumor secundário bem-sucedido (FIDLER, 2002). Novas metástases poderão ocorrer a partir do tumor primário e/ou secundário, seguindo os mesmos princípios.

Figura 1: Passos interdependentes durante o processo metastático



Fonte: Adaptado de Fidler, 2003.

A indução e estabelecimento de um processo metastático ocorre pela interação bem-sucedida entre a(s) célula(s) tumoral(ais) metastática(s) inicial(ais), o local e microambiente do segundo foco tumoral, onde essa célula consegue colonizar e sobreviver com sucesso (FIDLER E KRIPKE, 2015). Esse sucesso também depende das propriedades metastáticas desta(s) célula(s) tumoral(ais) primária(s), que permite a ela(s) iniciar e realizar metástase (FIDLER E KRIPKE, 2015; JOYCE, POLLARD, 2009). Em alguns tipos de tumores, é possível observar um padrão de

metástases para alguns órgãos específicos, quando as células tumorais frequentemente e preferencialmente colonizam os mesmos tecidos, como por exemplo, cânceres de mama, que realizam metástase frequentemente para os ossos, fígado, cérebro, pulmões e nódulos linfáticos (CHAMBERS, GROOM, MACDONALD, 2002; MÜLLER et al., 2001).

1.3 METÁSTASE E MIGRAÇÃO DIRECIONAL

Durante a metástase, é necessário que as células tumorais utilizem mecanismos migratórios semelhantes aqueles realizados por células saudáveis, como as células imunológicas, por exemplo (FRIEDL E WOLF, 2003; FRIEDL E BRÖCKER, 2000). Para a migração celular acontecer há vários passos interdependentes pelos quais a célula deve passar. Em um primeiro momento, ocorre a formação e adesão de extensões membranares da frente de migração à matriz extracelular. Em seguida, há a contração do corpo celular, gerando a tração necessária para a condução. Por fim, há a subsequente retração da parte posterior da célula (TALMADGE E FIDLER, 2010).

A migração celular pode ser de dois tipos: randômica ou direcional. A primeira consiste na motilidade celular sem direção específica, e a segunda, também conhecida como quimiotaxia, ocorre quando há um fator induzindo a direção do deslocamento através do seu gradiente de concentração (PETRIE, DOYLE, YAMADA, 2009). O fator que induz a formação da frente de migração e o estímulo de motilidade celular em direção ao seu gradiente de concentração é chamado de quimioatrativo (PETRIE, DOYLE, YAMADA, 2009; FRIEDL, WOLF, 2003).

1.4 O EIXO CXCR4/SDF-1 E SUA RELAÇÃO COM CÂNCER

O fator SDF-1 (do inglês, “stromal cell-derived factor-1”, também conhecido como CXCL12, do inglês “C-

X-C motif chemokine 12”) é uma quimiocina que se liga e ativa o receptor CXCR4 (Receptor do tipo GPCR (Motivo C-X-C de Receptor de Quimiocina, ou do inglês, “C-X-C Motif Chemokine Receptor 4”) (TEICHER E FRICKER, 2010). Quimiocinas são citocinas importantes para processos inflamatórios e homeostáticos: as quimiocinas inflamatórias induzirão eventos inflamatórios (como tráfego de leucócitos), enquanto as quimiocinas homeostáticas são constantemente liberadas e expressas para manter a homeostase fisiológica do indivíduo para várias funções, da organogênese à migração celular (ZLOTNIK E YOSHIE, 2012; TEICHER E FRICKER, 2010).

A secreção da quimiocina SDF-1 está presente no indivíduo em diversos órgãos como, pulmão, fígado, cérebro, rins, músculo esquelético, pele, coração, nódulos linfáticos e medula óssea (TEICHER E FRICKER, 2010). A expressão do seu receptor CXCR4 no corpo também é bem ampla, estando presente em células hematopoiéticas (como linfócitos B, T, monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos), em células diversas (endoteliais, epiteliais, micrógliia, astrócitos, neuronais, progenitoras endoteliais e de músculo liso, células-tronco embrionárias pluripotentes e multipotentes de tecidos variados como neuronal, muscular esquelético, cardíaco, endotelial e hepático) e em vários tecidos (pulmão, fígado, cérebro, coração, cólon e rins) (TEICHER E FRICKER, 2010).

Esse eixo CXCR4/SDF-1 regula várias vias de sinalização intracelular, relacionadas com a quimiotaxia, sobrevivência celular, proliferação, aumento de cálcio intracelular e transcrição gênica (TEICHER E FRICKER, 2010). As quimiocinas homeostáticas, como o SDF-1, podem atuar como quimioatrativos de células que expressam o seu receptor, no caso o CXCR4, onde o gradiente de concentração do quimioatrativo induz e direciona para si a migração das células que possuem o seu receptor (TEICHER E FRICKER, 2010; PETRIE, DOYLE, YAMADA, 2009).

Uma função homeostática e quimioatrativa importante que o receptor CXCR4 desempenha com SDF-1 é a manutenção de células-tronco hematopoéticas na medula óssea. Juntos promovem tanto a retenção das células-tronco no microambiente da medula óssea quanto a regulação do tráfico de linfócitos no organismo (ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; TEICHER E FRICKER, 2010).

Apesar da grande importância homeostática em indivíduos saudáveis, o eixo CXCR4-SDF-1 pode apresentar alterações em sua expressão em diversos cânceres, incluindo câncer oral, esofágico, gástrico, pancreático, hepático, pulmonar, cerebral, de cólon, tireóide, ovários, próstata, leucemia, melanoma e mamário (XU et al., 2015; ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; YAGI et al., 2011; TEICHER E FRICKER, 2010; MÜLLER et al., 2001). Especialmente em câncer de mama, foi visto que CXCR4 é altamente expresso em células tumorais mamárias humanas e em tecido tumoral mamário primário, sendo que a inibição do eixo CXCR4/SDF-1 comprometeu significativamente a metástase para nódulos linfáticos e pulmões em modelos de camundongos imunodeficientes (MÜLLER et al., 2001). Após essa descoberta inicial, outras pesquisas evidenciaram a associação de câncer de mama com a modulação da expressão de CXCR4 (XU et al., 2015; MUKHERJEE, ZHAO, 2013; YAGI et al., 2011; ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2001).

O papel dessa via de sinalização em tumores gira em torno do direcionamento da metástase de cânceres com alta expressão de CXCR4 para aqueles órgãos que secretam SDF-1 naturalmente, ao direcionar a migração e a induzir a polimerização de filamentos de actina, eventos importantes na modulação do citoesqueleto e consequentemente para a migração celular e formação de metástase (MÜLLER et al., 2001; TEICHER, FRICKER, 2010). No caso do câncer de mama, interessantemente muitos tumores mamários realizam metástase para órgãos que secretam SDF-1, como nódulos

linfáticos, ossos e pulmões, o que novamente traz importância para a via de sinalização de CXCR4 (XU et al., 2015; MUKHERJEE, ZHAO, 2013).

Por conta desse cenário de expressão em uma gama de doenças, foram conduzidas pesquisas tendo como alvo terapêutico a via de sinalização CXCR4-SDF-1 visando bloqueá-la ou inibir a cascata de sinalização induzida pela sua ativação (TEICHER E FRICKER, 2010). Porém, apesar de efetivo na diminuição da metástase, utilizar antagonistas para inibir CXCR4 também promove o esvaziamento das células-tronco da medula óssea. Esse efeito colateral é consequência da inibição da função homeostática de CXCR4, pois naturalmente retém as células-tronco hematopoiéticas na medula óssea junto com SDF-1 (DAR et al., 2011, ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; TEICHER E FRICKER, 2010; MÜLLER et al., 2001).

Mesmo com a disponibilidade de fármacos no mercado para tratar câncer e metástase, muitas vezes os tratamentos não são eficazes, podendo gerar resistência e recorrência nos pacientes (CLARKE et al., 2015; MARTINEZ-OUTSCHOORN, et al, 2011; LANGE E YEE, 2008). Além disso, há tumores difíceis de tratar por não expressarem nenhum alvo farmacológico de terapias hormonais atuais, como câncer de mama triplo-negativo. Esse tipo de câncer não apresenta expressão de receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e proteína HER2, os quais são alvos essenciais de terapias hormonais alvo-específicas para o tratamento de câncer de mama com Tamoxifeno para ER+ e Herceptina/Trastuzumab para HER2+ (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017; WANG et al, 2015; FIGUEIROA-MAGALHÃES et al, 2015; LIU et al, 2014; HACKSHAW et al, 2011). Dessa forma, os pacientes que não apresentam ER, PR ou HER2 não possuem tratamentos específicos e eficazes para sua doença.

Considerando a necessidade de encontrar novos alvos para terapias alvo-específicas em câncer de mama e sendo o eixo CXCR4/SDF-1 importantes nesse tipo de

doença, é interessante identificar alvos mais específicos abaixo da cascata de sinalização ativada por CXCR4 e SDF-1 para obter maior eficiência de tratamento contra a disseminação de tumores que se utilizam desse eixo de sinalização durante a metástase (XU et al., 2015; ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; MÜLLER et al., 2001).

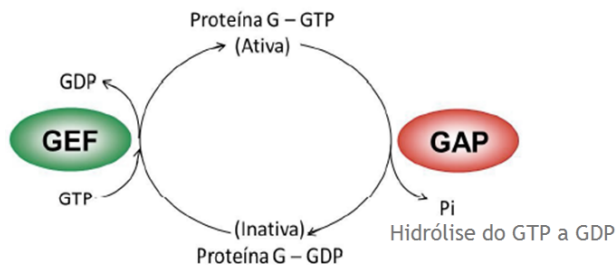
1.5 PROTEÍNAS G E PEQUENAS PROTEÍNAS G

O CXCR4 é um Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR, do inglês “G-Protein coupled receptor”). A Proteína G acoplada a esse receptor é um complexo heterotrimérico, sendo formada por três subunidades $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$, que também exerce atividades de GTPase (TEICHER E FRICKER, 2010). A ativação do GPCR através de um ligante induz a dissociação das subunidades em $G\alpha$ e o dímero de $G\beta$ e $G\gamma$, o $G\beta\gamma$. Dessa forma, essas subunidades poderão induzir cascatas de sinalização cujas funções finais irão depender da família de $G\alpha$, que poderá ser $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12}$, além das vias específicas reguladas por $G\beta\gamma$ (TEICHER E FRICKER, 2010). Essas diferentes cascatas de sinalização induzem a ativação de Pequenas Proteínas G, também GTPases, reguladoras da polimerização e despolimerização de filamentos de actina, necessária para a modulação do citoesqueleto, migração e adesão celular (TEICHER E FRICKER, 2010; RIDLEY, 2006; ROSSMAN, DER, SONDEK, 2005; JAFFE E HALL, 2005).

As Pequenas Proteínas G alternam entre estado ativo, quando ligadas à guanosina trifosfato (GTP) e estado inativo, quando ligadas à guanosina difosfato (GDP). As Pequenas Proteínas G são muito importantes para vários processos celulares, como morfologia, motilidade de citocinese, por causa das suas atividades de GTPase e regulação de transdução de sinal (Figura 2) (GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014; ROSSMAN, DER, SONDEK, 2005;).

Para conseguirem alternar entre seu estado ativo e inativo, as Pequenas Proteínas G necessitam de auxílio de dois grupos de elementos: fatores de troca de nucleotídeo guanina (do inglês, “guanine exchange factor”, GEF), que ativam a Pequena Proteína G ao ligá-la a uma molécula de GTP; e proteínas ativadoras de GTPase (GAP, do inglês “GTPase-Activating Proteins”), que inativam as Pequenas Proteínas G ao estimularem a hidrólise do GTP à GDP (GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014). A superfamília Rho de Pequenas Proteínas G (Rho GTPases) é subdividida em três famílias, as Rac, Rho e Cdc42, diferenciadas pelos seus domínios proteicos básicos e com isoformas variadas, podendo ser ativadas por GEFs das famílias DOCK e Dbl (COOK, ROSSMAN, DER, 2014; ROSSMAN, DER, SONDEK, 2005; JAFFE E HALL, 2005;). Há evidências da participação de todas essas três famílias em motilidade celular, tanto na formação da frente de migração quanto na polimerização de filamentos de actina (SANZ-MORENO et al., 2008).

Figura 2: Esquema da ativação e inativação de proteínas G por fatores GEF e GAP, respectivamente. O fator GEF ativa a proteína G ao trocar GDP por GTP, e o fator GAP inativa a proteína G ao estimular a hidrólise de GTP à GDP.



Fonte: Elaborado por Patricia Dillenburg e adaptado por Aruana Hansel.

A família DOCK de GEFs compreende 11 fatores ativadores de RhoGTPases das subfamílias Rac e/ou Cdc42, em mamíferos (YU et al., 2015; LAURIN E CÔTÉ, 2014; COOK, ROSSMAN, DER, 2014; GADEA E BLANGY, 2014). Por meio da ativação de RhoGTPases, fatores GEFs DOCK participam de processos de motilidade e adesão celular, através da regulação do citoesqueleto de actina e formação da frente de migração da célula (GADEA E BLANGY, 2014; GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014). A expressão desses fatores foi documentada em tecidos variados como hematopoiético, linfático, ósseo, neuronal, cerebral, epitelial, assim como células imunológicas (GADEA E BLANGY, 2014).

Especificamente sobre DOCK11, o último membro da família DOCK a ser descoberto e foco deste trabalho, há evidências da sua expressão em tecidos como fígado, timo, medula óssea e especialmente em células linfócitos B e T (GADEA E BLANGY, 2014; NISHIKIMI et al., 2005). Assim como outros membros de sua família, DOCK11 também teve sua participação documentada em processos celulares de migração (GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014; GADEA E BLANGY, 2014).

Entretanto, a modulação da expressão de fatores DOCK não foi observada somente em células e tecidos saudáveis, mas também em várias doenças, como as do desenvolvimento, neuropsiquiátricas, ósseas e cânceres, como neuronais, linfáticos, pulmonares, mamários, de próstata e ovários (YU et al., 2015; GADEA E BLANGY, 2014; SANZ-MORENO et al., 2008). Dentre essas malignidades, especificamente o fator DOCK11 foi notado com modulação de sua expressão em carcinoma testicular e linhagens tumorais de linfomas (GADEA E BLANGY, 2014).

A modulação da expressão de DOCK11 também foi vista em experimentos de migração direcional *in vitro*, na linhagem tumoral HeLa, de câncer de colo de útero, documentados em dados ainda não publicados pelo mesmo grupo dessa pesquisa. Foi feita uma triagem de biblioteca de

pequenos RNAs de interferência (siRNA) testando a capacidade de migração direcional das células tumorais após sofrerem diminuição da expressão de GEFs ativadoras de RhoGTPases (DILLENBURG-PILLA et al., 2017). As células foram induzidas à migração em direção ao quimioatrativo SDF-1, portanto estimulando vias de sinalização de CXCR4 e de Pequenas Proteínas G da superfamília Rho (TEICHER E FRICKER, 2010; ROSSMAN, DER, SONDEK, 2005). Esses dados mostraram que quando as células tumorais tiveram sua expressão de DOCK11 diminuídas, também diminuiu a sua capacidade de migração direcional para SDF-1, mostrando que a menor expressão de DOCK11 afeta a eficiência da quimiotaxia em células tumorais HeLa para SDF-1.

Desse modo, é levantada a hipótese de que DOCK11 contribui para a migração de células tumorais. Mais ainda, que há a participação de DOCK11 na mesma via de sinalização de SDF-1 em quimiotaxia. Visto que SDF-1 é o ligante e quimioatrativo de CXCR4, podemos supor um eixo de sinalização em migração direcional que participem CXCR4, SDF-1 e DOCK11. Além disso, considerando que CXCR4 é muito importante para metástase de câncer de mama, podemos supor que a modulação da expressão de DOCK11 será maior nesse tipo de tumor.

1.6 JUSTIFICATIVA

Os pacientes com câncer têm seu quadro clínico agravado quando as células tumorais fazem metástase e formam novos focos de tumores pelo corpo, sendo que a maioria das mortes causadas por câncer é em decorrência da doença em estado metastático (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; ECKHARDT et al., 2012).

Os objetivos principais dos tratamentos atuais contra os cânceres metastáticos visam controlar o crescimento do tumor primário e aliviar os sintomas consequentes disto, sendo que não há tratamentos eficazes que impeçam a migração de células cancerígenas e que previnam a disseminação dos tumores (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017). Além disso, quando há tratamento, é comum o desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados (WHEELER, DUNN, HARARI, 2010), assim como há a impossibilidade de se utilizar alguns fármacos conhecidos, pois inibem vias de sinalização importantes para a homeostase do indivíduo (DAR et al., 2011, ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; TEICHER E FRICKER, 2010; MÜLLER et al., 2001). Portanto, a busca por novos alvos farmacológicos traria benefícios aos pacientes cujas atuais terapias anti-metástase não estão sendo efetivas.

Dado o exposto, os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na migração celular não estão totalmente elucidados, e uma maneira de conhecer mais sobre este processo é através dos fatores que os ativam. Por conta disso, é importante estudar mais a fundo o papel específico de DOCK11 na quimiotaxia celular, visto que ele é um ativador de Pequenas Proteínas G, cuja ativação promovida por SDF-1 promove migração direcional de células tumorais. O entendimento do possível envolvimento de DOCK11 neste mecanismo migratório de células tumorais não somente traz conhecimento de uma via pouco conhecida, mas também há o potencial translacional tomando-o como alvo terapêutico,

através da elaboração de fármacos e tratamentos contra metástases que se utilizam da via de sinalização do alvo molecular específico.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Estudar a contribuição do fator de troca de nucleotídeo guanina DOCK11 na migração e metástase de células tumorais.

1.7.2 Objetivos Específicos

- I. Padronizar a metodologia de transfecção de siRNA em células tumorais HeLa;
- II. Investigar o papel de DOCK11 na migração randômica em células tumorais HeLa;
- III. Verificar a alteração da expressão de DOCK11 através de análises de bioinformática com dados de sequenciamento de tumores mamários;
- IV. Correlacionar a modulação da expressão de DOCK11 com o prognóstico e a incidência de invasão tecidual e metástase através de análises de bioinformática com dados de sequenciamento de tumores mamários;
- V. Buscar correlação da modulação da expressão de DOCK11 com a modulação da expressão de CXCR4 através de análises de bioinformática com dados de sequenciamento de tumores mamários.

2 METODOLOGIA

2.1 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de câncer de colo de útero humana HeLa foi cultivada em meio DMEM (Gibco) com 1% de antibióticos (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). As repicagens 2 a 3 vezes por semana foram feitas utilizando PBS e Tripsina com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,05% de concentração (Gibco). As células foram mantidas na incubadora a 5% de CO₂ e a 37°C.

2.2 TRANSFEÇÃO DE siRNA

A diminuição da expressão de RNAm de DOCK11 e controle foi feita através de transfecção de siRNA utilizando reagentes e protocolo do fabricante Invitrogen. Para colocar o siRNA do gene alvo para dentro das células, foi feito um complexo de transfecção composto por 7,5 µl de 50nM de siRNA (siDOCK11 ou siControle, com RNA não-condificante) mais 2,5 µl de reagente lipofectamina siRNA iMAX® e mais 125 µl de meio DMEM sem SFB e nem antibióticos, pois a combinação do antibiótico com a transfecção causa morte celular por toxicidade, segundo o fabricante. Após a mistura incubar por 20 minutos, o complexo de transfecção foi aplicado nas placas de cultura lavadas com PBS e cultivadas com meio DMEM com suplementação de 10% de SFB, para manter a sobrevivência das células por todos os dias de experimento, mas ainda sem adição de antibióticos. A transfecção de siRNA foi feita em placas de 3,5 cm de diâmetro com confluência celular entre 50-70%.

2.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Após 48h da transfecção de siRNA, a extração do RNA total das amostras foi feita utilizando o reagente Trizol

(Invitrogen Ambion 15596026), com 1 mL por amostra em placa de 3,5 cm de diâmetro. Após incubar por 5 minutos à temperatura ambiente, 200 µl de clorofórmio foi adicionado para posteriormente centrifugar a 4°C por 15 minutos em força centrífuga relativa de 12000 g. A fase aquosa transparente superior contendo o RNA foi isolada e incubada com 500 µl de isopropanol 100% por 10 minutos à temperatura ambiente para posteriormente ser centrifugada a 4°C por 10 minutos em força centrífuga relativa de 12000g. Descartando o sobrenadante, a amostra foi lavada com 1000 µl de etanol 75% e centrifugado a 4°C por 5 minutos em força centrífuga relativa de 7500 g. Após o descarte do sobrenadante e a secagem completa à temperatura ambiente, a amostra foi suspensa com água livre de nucleases. A concentração e qualidade do RNA foi avaliada por NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), sendo selecionadas as amostras de concentração superior a 200ng/µl, com fases ideais de contaminação de proteínas A260/280 entre 1,8 e 2,1, e de contaminação com solventes orgânicos A260/230 entre 1,5 e 2.

2.4 TRATAMENTO COM DNASE

O tratamento das amostras de RNA de células transfectadas com siDOCK11 e siControle foi feito com DNase do kit de reagentes da Promega. Foram misturadas 1 µl de reação tampão 10X, 1 µl de DNase, 1 µg de amostra de RNA e o suficiente de água livre de nucleases até atingir o volume de 10 µl. A solução foi incubada em banho seco a 37°C por 30 minutos. Depois foi adicionado 1 µl de solução para parar a ação da DNase (do inglês, “DNase Stop Solution”) para ser novamente incubada a 65°C no banho-maria por 10 minutos.

2.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a transcrição reversa para o DNA complementar (cDNA) a partir do RNA de células transfectadas com siDOCK11 e siControle, foi usado o kit ImProm II (Promega A3802). Nas amostras foi adicionado 1 µl de Iniciadores Oligo DT (do inglês, “Primer Oligo DT”) e incubado em banho-maria por 5 minutos a 70°C. Enquanto isso, o complexo de transcrição foi preparado adicionando 4 µl de reação tampão 5X, 2.4 µl de MgCl₂ a 25 mM, 1 µl de nucleotídeos “dNTP Mix” e 1 µl de enzima de transcrição reversa. Para cada amostra, uma alíquota de 8.4 µl desse complexo de reagentes foi utilizado. As amostras foram então incubadas em banho seco primeiramente a 25°C por 5 minutos, depois a 42°C por 60 minutos e então 70°C a 15 minutos.

2.6 PCR

Foi realizado um experimento de PCR com replicatas técnicas (duplicata de amostra) com o objetivo de fazer o controle da qualidade das amostras do cDNA do RNA extraído de células transfectadas com siDOCK11 e siControle e células HeLa sem processo de transfecção (caráter selvagem, do inglês “*Wild Type* – *WT*”).

Para amplificar o cDNA para o gene de referência GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, do inglês, “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”) foram utilizados os reagentes do kit “GoTaq Green Master Mix 2x” (Promega M712B). Para cada 1 µl de amostra, foi misturado um complexo de reagentes composto por 5 µl de enzima polimerase “TAQ”, 2 µl de água livre de nucleases, 1 µl de iniciadores senso de GAPDH e 1 µl de iniciadores anti-senso do mesmo gene, em concentrações de 10 µM. As sequências dos iniciadores utilizados foram hGAPDH iniciador senso GAGTCAACGGATTTGGTCGT e iniciador anti-senso TTGATTTTGGAGGGATCTCG.

A amplificação das amostras foi feita no termociclador Eppendorf Mastercycler, ajustando o programa

para 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma etapa final de 72°C por 10 minutos.

A eletroforese posterior foi realizada com gel de Agarose a 2% e solução tampão TAE , utilizando 10 µl de cada amostra amplificada, com 3 µl de padrão de peso molecular de 100 pares de base da fabricante Promega G210A e a 120 volts por 20 minutos. Depois, o gel foi banhado em brometo por 20 minutos e as bandas foram visualizadas na luz ultra-violeta em sistema de captura de imagem XYZ.

2.7 PCR EM TEMPO REAL

A análise da expressão de RNA mensageiro (RNAm) das células após a transfecção com siDOCK11 e siControle foi realizada através de PCR em Tempo Real com o kit de reagentes “SYBR Green Master Mix” (fabricante Thermo Fisher Scientific). Para cada 1 µl de amostra, foi misturado um complexo de reagentes composto por 5 µl de enzima polimerase, 1 µl de iniciadores senso de GAPDH ou DOCK11 e 1 µl de iniciadores anti-senso do mesmo gene, em concentrações de 10 µM. As sequências dos iniciadores utilizados foram: hDOCK11 iniciador senso TTCAGAGGCTGCGATGTGTT, iniciador anti-senso ACGCTGAACATCCGTTAGGA; hGAPDH iniciador senso GAGTCAACGGATTTGGTCGT, iniciador anti-senso TTGATTTTGAGGGATCTCG.

A ciclagem foi feita na máquina de PCR Tempo Real HT7900 ajustando o programa para 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, com uma etapa final de 72°C por 10 minutos.

A visualização e leitura dos dados do PCR em tempo real foi feita no software SDS 2.4. Foi analisada a aparente homogeneidade nos picos das curvas de dissociação dos iniciadores. Além disso, foram considerados os valores de CT (Ciclo Limiar, do inglês “Threshold Cycle”) nas curvas de

amplificação dos iniciadores para o posterior cálculo do $\Delta\Delta Ct$. Os valores de $2(\Delta\Delta Ct)$ para RNAm de DOCK11 e GAPDH foram normalizados para GAPDH e plotados em gráfico junto ao GraphPad Prism.

2.8 TRATAMENTO COM MITOMICINA C

Para padronizar a concentração de Mitomicina C e controlar a inibição da proliferação, fotografias foram feitas sete dias após a aplicação do reagente nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, em uma confluência celular mínima de 10 mil células em placa de cultura de 10 cm de diâmetro. Além disso, foram testados conjuntamente dois tipos de meio DMEM, com e sem a suplementação de 10% de SFB, para observar se causaria alguma interferência. As fotografias foram tiradas com o software CellSens Entry acoplado a câmera Olympus DP73 no microscópio de contraste de fase Olympus IX71.

Para inibir a proliferação celular antes do ensaio de migração, observando somente a migração randômica sem influência da proliferação celular, foi feito tratamento com o reagente Mitomicina C. As células foram tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C por duas horas antes do experimento de migração.

2.9 FECHAMENTO DE FERIDA *IN VITRO*

Para observar simultaneamente o comportamento migratório e proliferativo das células tumorais HeLa tratadas com siDOCK11 e siControle, foram feitos ensaios de fechamento de ferida *in vitro*, do inglês “Wound Healing” (LIANG, PARK, GUAN, 2007). Essa estratégia é similar à de outros experimentos de migração com transfecção de siRNA, nos quais a utilização de um grupo controle de células não-transfectadas é dispensável (DILLENBURG-PILLA et al., 2015).

Para fazer a transfecção de siRNA, foi elaborado um complexo de transfecção composto por 7,5 µl de 50nM de siRNA (siDOCK11 ou siControle, com RNA não-condificante) mais 2,5 µl de reagente lipofectamina siRNA iMAX® e mais 125 µl de meio DMEM sem SFB e nem antibióticos. Após a mistura incubar por 20 minutos, o complexo de transfecção foi aplicado nas placas de cultura de 3,5 cm de diâmetro com as células HeLa em 70% de confluência, já lavadas com PBS e mantidas com meio DMEM com suplementação de 10% de SFB sem adição de antibióticos.

Após 48h da transfecção, com as células em 100% de confluência, foi feita a raspagem em cruz com ponteiros de 10 µL. Após a raspagem, foram realizadas subsequentes lavagens com PBS para eliminar as células em suspensão. O posterior cultivo celular foi feito com meio DMEM (Gibco) com 1% de antibióticos (Gibco) sem suplementação de 10% de SFB.

Para analisar os resultados do ensaio de fechamento de ferida *in vitro*, quatro fotos de cada poço foram tiradas, uma de cada braço da cruz, rente à encruzilhada, nos tempos 0h, 24h e 48h após o risco na placa ter sido feito. As fotografias foram tiradas no microscópio de contraste de fase Olympus IX71 acoplado a câmera Olympus DP73 utilizando o programa CellSens Entry.

A análise das fotografias feitas nos tempos 0h, 24h e 48h foi feita no software Image J. Foram traçadas cinco linhas verticais relativamente equidistantes horizontalmente entre as duas margens da ferida, para averiguar a proporção de fechamento de cada área. As distâncias foram relativizadas como porcentagem de fechamento e esses valores foram analisados no programa GraphPad Prism, utilizando o teste t independente entre cada grupo experimental e seu controle e considerando significância de p menor que 0.05.

2.10 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Para observar a migração randômica das células tumorais HeLa sem a variável da proliferação celular, foram feitos ensaios de migração parecidos com o ensaio de fechamento de ferida *in vitro* com a diferença de que aqui foi utilizado o inibidor de proliferação Mitomicina C. Essa estratégia é similar à de outros experimentos de migração com transfecção de siRNA, nos quais a utilização de um grupo controle de células não-transfectadas é dispensável (DILLENBURG-PILLA et al., 2015).

Para fazer a transfecção de siRNA, foi elaborado um complexo de transfecção composto por 7,5 µl de 50nM de siRNA (siDOCK11 ou siControle, com RNA não-condificante) mais 2,5 µl de reagente lipofectamina siRNA iMAX® e mais 125 µl de meio DMEM sem SFB e nem antibióticos. Após a mistura incubar por 20 minutos, o complexo de transfecção foi aplicado nas placas de cultura de 3,5 cm de diâmetro com as células HeLa em 70% de confluência, já lavadas com PBS e mantidas com meio DMEM com suplementação de 10% de SFB sem adição de antibióticos.

Após 48h da transfecção, com as células em 100% de confluência, foi feita a inibição da proliferação aplicando 30 µl do inibidor Mitomicina C de concentração 10 µg/ml em 1,5 ml de meio DMEM com 10% de SFB e sem antibióticos. As placas foram incubadas na incubadora a 5% de CO₂ e a 37°C durante 2 horas.

Após as placas incubarem por 2 horas, foi feita a raspagem em cruz com ponteiros de 10 µl. Em seguida, foram realizadas subsequentes lavagens com PBS para eliminar as células em suspensão. O posterior cultivo celular foi feito com meio DMEM (Gibco) com 1% de antibióticos (Gibco) sem suplementação de 10% de SFB.

Para analisar os resultados da migração, quatro fotos de cada poço foram tiradas, uma de cada braço da cruz, rente à encruzilhada, nos tempos 0h, 24h e 48h após o risco

na placa ter sido feito. As fotografias foram tiradas no microscópio de contraste de fase Olympus IX71 acoplado a câmera Olympus DP73 utilizando o programa CellSens Entry.

A análise das fotografias feitas nos tempos 0h, 24h e 48h foi feita no software Image J. Foram traçadas cinco linhas verticais relativamente equidistantes horizontalmente entre as duas margens da ferida, para averiguar a proporção de fechamento de cada área. As distâncias foram relativizadas como porcentagem de fechamento e esses valores foram analisados no programa GraphPad Prism, utilizando o teste t independente entre cada grupo experimental e seu controle e considerando significância de p menor que 0.05.

2.11 MICROSCOPIA

As fotografias desse trabalho foram tiradas no microscópio de contraste de fase Olympus IX71 acoplado a câmera Olympus DP73 utilizando o programa CellSens Entry para analisar as imagens.

2.12 ESTATÍSTICA

Nos experimentos de fechamento de ferida *in vitro* e ensaio de migração, os valores das distâncias entre margens de ferida foram relativizados como porcentagem de fechamento e analisados no programa GraphPad Prism utilizando o teste t independente entre cada grupo experimental e seu controle, considerando significância de p menor que 0.05.

No experimento de PCR em tempo real, foram considerados os valores de CT (Ciclo Limiar, do inglês “Threshold Cycle”) nas curvas de amplificação dos iniciadores para o posterior cálculo do $\Delta\Delta Ct$. Os valores de $2(\Delta\Delta Ct)$ de siControle e siDOCK11 foram colocados em gráfico junto ao GraphPad Prism. Os dados de RNAm de DOCK11 e GAPDH foram normalizados para RNAm de GAPDH e analisados no mesmo programa utilizando o teste t

independente entre o grupo experimental e seu controle, considerando significância de p menor que 0.05.

2.13 BIOINFORMÁTICA

As análises de bioinformática de modulação da expressão de DOCK11 e CXCR4, em sequenciamento genético de tumores de mama e com correlação de dados clínicos dos (das) pacientes, foram feitas na plataforma demonstrativa Oncomine (<http://oncomine.org/>). Essa plataforma agrupa dados de estudos que disponibilizam o sequenciamento genético de milhares de tumores e os dados clínicos dos seus respectivos pacientes, permitindo a análise da expressão de genes através da seleção de filtros de busca específicos (RHODES, D. R. et al., 2007).

Para ter acesso ao banco de dados, foi necessário cadastrar e-mail institucional e criar uma senha. A opção de exportar as análises e figuras geradas não é disponibilizada gratuitamente na plataforma, portanto não foi possível fazer análises estatísticas dos gráficos gerados. Além disso, todas as figuras de resultados obtidos nesse estudo foram feitas com capturas de tela e posteriores edições e traduções das legendas, utilizando o programa Microsoft Power Point.

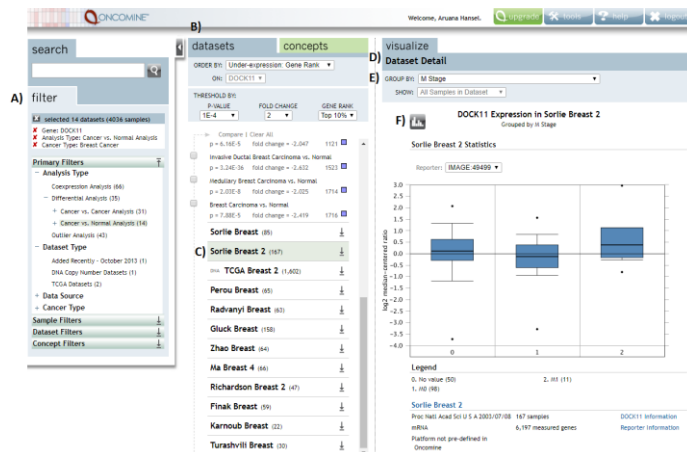
2.11.1 Modulação da expressão de DOCK11 em tumores agrupados por metástase e invasão linfática

Para avaliar a modulação da expressão de DOCK11 na base de dados, foi feita a pesquisa no campo de busca com o termo “DOCK11” e selecionado a opção “DOCK11 (gene)”. Feita a busca, foi apresentado um quadro-resumo da doença para DOCK11 (no site, em inglês, como “*Disease Summary for DOCK11*”), com tipos de análise separadas por tipo de câncer. Neste quadro, foi selecionado o câncer de mama (alternativa no site, em inglês, como “*Breast Cancer*”) na análise “câncer *versus* normal”. A página foi redirecionada para a visualização das análises diferenciais (no site, em

inglês, como “*Visualize – Differential Analysis*”) do primeiro da lista de conjunto de dados (no site, em inglês, como “*Datasets*”) disponível para seleção. Ao total, nesta lista foram disponibilizados 14 conjuntos de dados, compilando 4036 amostras. Na coluna de conjunto de dados é selecionado o limiar (do inglês, “*Threshold*”) de valores de P (do inglês, “*P-value*”) menores que 1E-04, ou $P < 0,0001$. A versão gratuita da plataforma não permite a exportação de dados específicos da análise.

Na lista de conjuntos de dados, primeiramente foi selecionado o estudo “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003). No quadro de visualização (no site, em inglês, como “*Visualize – Dataset Detail*”), em um primeiro momento, foi selecionado o agrupamento por estágio M (no site, em inglês, como “*M Stage*”) com 109 amostras de câncer de mama e 50 de tecido normal. O agrupamento condiz M0 para ausência de metástase, M1 para presença de metástase e 0 para tecido normal, segundo a classificação TNM que caracteriza o tumor primário (T), nódulos linfáticos com presença de câncer (N) e presença de metástase (M) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017). Em um segundo momento, os dados contendo 89 amostras de carcinoma ductal de mama e 70 de tecido saudável foram agrupados por estágio M em carcinoma ductal de mama [no site, em inglês, como “*M Stage (Ductal Breast Carcinoma)*”]. Em seguida ao agrupamento, o ícone para visualizar o gráfico na forma de *boxplot* foi selecionado. Em todas as análises seguintes, os gráficos foram apresentados em *boxplot*, não sendo necessário selecionar o ícone novamente. Foram feitas capturas de tela e posterior edições e traduções das legendas dos gráficos gerados, no programa Microsoft Power Point (Figura 3).

Figura 3: Captura de tela do site Oncomine mostrando: A) os filtros escolhidos para pesquisa dentre os filtros primários (do inglês, “Filter” e “Primary Filters”, respectivamente); B) conjuntos de dados disponíveis para análise (do inglês, “Datasets”); C) seleção do estudo “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003); D) visualização detalhada do conjunto de dados (do inglês, “Dataset detail”); E) agrupamento das amostras por estágio M (do inglês, “Group by: M Stage”); F) visualização do gráfico em boxplot.



A análise seguinte foi feita selecionando “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012) e agrupando os dados por invasão linfática (do inglês, “*Lymphatic Invasion*”), dividida em invasão linfática ausente, moderada, severa e tecido normal.

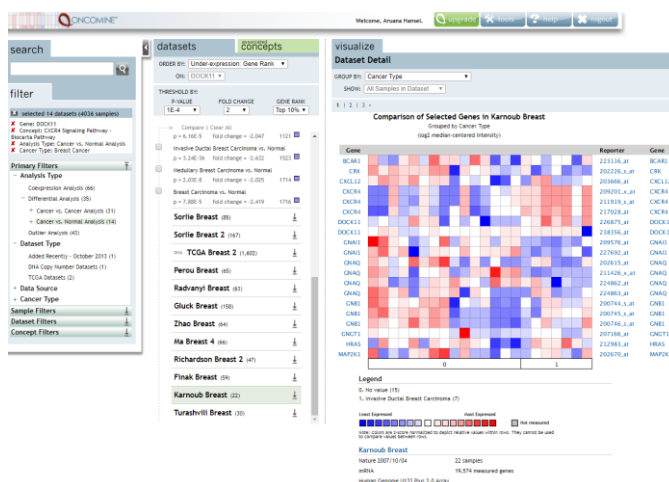
2.11.2 Modulação da expressão de DOCK11 e CXCR4 simultaneamente

Para avaliar a modulação da expressão de ambos CXCR4 e DOCK11, após essas análises de estudos individuais, na mesma página foi feita a pesquisa no campo de busca por “CXCR4” e selecionado a opção “*CXCR4 Signalling Pathway – Biocarta Pathway*” (inglês para “Via de Sinalização de CXCR4 – Via de Biocarta”). Desta forma, o quadro de análise diferencial mudou para uma comparação da expressão de DOCK11 e outros genes na via de sinalização de CXCR4 no primeiro conjunto de dados da lista. Em seguida, foi selecionado o estudo “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007) na lista de dados com 22 amostras de carcinoma ductal invasivo de mama e tecido saudável. No quadro de visualização, foi apresentada a modulação da expressão de muitos genes, agrupado por tipo de câncer, que no caso do estudo, era Carcinoma ductal invasivo de mama (em inglês, “*Invasive Ductal Breast Carcinoma*”). Na edição de imagem dessa figura, no programa Microsoft Power Point, foram cortadas as linhas dos genes acima e abaixo de CXCR4 e DOCK11 que agruparam juntos, por serem irrelevantes para o objetivo desta pesquisa.

Outra análise da expressão simultânea de DOCK11 e CXCR4 foi feita em seguida ao selecionar “Curtis Breast” para visualização. Os dados foram agrupados por invasão linfática (em inglês, “*Lymphatic Invasion*”) grupos de tecido saudável com 1980 amostras, tecido tumoral sem invasão linfática com 22 amostras, e os graus de invasão linfática moderada e severa, com 90 e 44 amostras respectivamente. Considerando o grande número de amostras de tecido normal (1980 amostras), durante a edição dessa figura, a coluna do tipo tecido normal foi descartada. Da mesma forma que a análise anterior, no programa Microsoft Power Point também foram cortadas as linhas de expressão de genes irrelevantes

para o estudo, deixando apenas CXCR4 e DOCK11, que novamente agruparam juntos.

Figura 4: Captura de tela da plataforma livre Oncomine destacando a visualização da modulação da expressão de DOCK11 e variados genes da via de sinalização de CXCR4, no conjunto de dados “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007), agrupado por tipo de câncer e comparado com tecido normal.

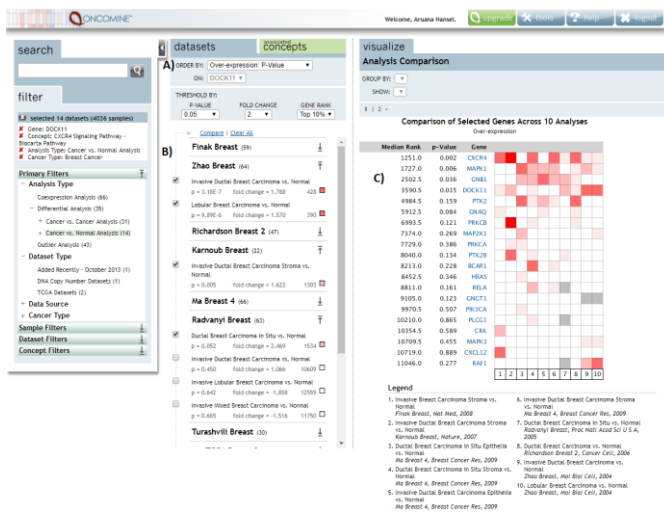


Para comparar a modulação da expressão de DOCK11 e CXCR4 entre estudos diferentes, os conjuntos de dados foram ordenados pelo valor de P em superexpressão (no site, em inglês, como “*Over-expression: P-Value*”). Na lista de conjuntos de dados, foi selecionada a seta para baixo ao lado dos títulos dos estudos de “Karnoub Breast”, “Radvanyi et al” e “Zhao et al” (KARNOUB et al., 2007; RADVANYI et al., 2005; ZHAO et al., 2004). Dessa forma, em cada estudo foram apresentadas detalhadamente uma lista de conjunto de

amostras mais específicas. Com isso, foi possível selecionar especificamente as caixas ao lado dos conjuntos de amostras seguintes: estroma de carcinoma ductal invasivo de mama versus normal (do inglês, “*Invasive Ductal Breast Carcinoma Stroma*”) em “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007); carcinoma ductal invasivo de mama in situ versus normal (do inglês, “*Ductal Breast Carcinoma in Situ vs. Normal*”) em “Radvanyi Breast” (RADVANYI et al., 2005); carcinoma ductal invasivo de mama versus normal (do inglês, “*Invasive Ductal Breast Carcinoma versus Normal*”) e carcinoma lobular de mama (do inglês, “*Lobular Breast Carcinoma versus Normal*”) ambos em “Zhao Breast” (ZHAO et al., 2004).

Após a seleção desses conjuntos de amostras, foi clicada a palavra “Compare” acima da lista de conjunto de dados, para efetivar a análise (Figura 5). Foi feita a edição da imagem capturada eliminando as linhas de genes irrelevantes para esse trabalho, no programa Microsoft Power Point.

Figura 5: Captura de tela da plataforma livre OncoPrint destacando: A) a ordem dos estudos por valor de P em superexpressão; B) seleção para comparação simultânea dos conjuntos de dados “Karnoub Breast”, “Radvanyi et al” e “Zhao et al” (KARNOUB et al., 2007; RADVANYI et al., 2005; ZHAO et al., 2004); C) modulação da expressão de DOCK11 e genes da via de sinalização de CXCR4.



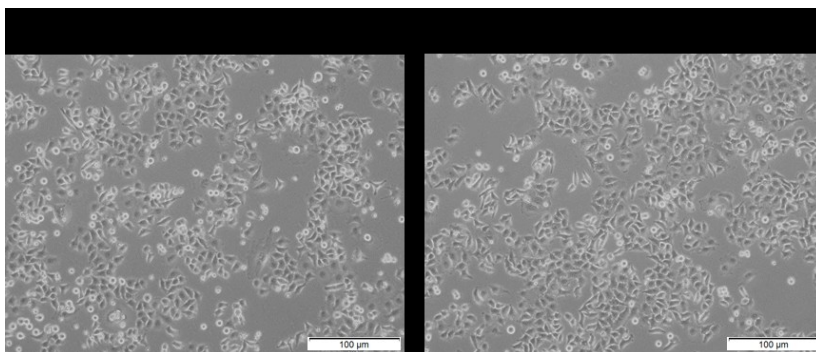
Em todas as análises simultâneas entre DOCK11 e CXCR4, a cor das células apresentando a modulação da expressão indicavam a maior ou menor expressão do gene analisado, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. O grau de intensidade de cor indicava o destaque do gene analisado no ranking de genes mais modulados na análise.

3 RESULTADOS

3.1 MENOR EXPRESSÃO DE DOCK11 E MORFOLOGIA CELULAR NORMAL APÓS TRANSFEÇÃO DE siRNA

Para conferir a morfologia das células após o protocolo de transfecção de siRNA, foram tiradas fotografias de contraste de fase. A morfologia apresentou-se semelhante entre as células transfectadas com siControle e siDOCK11. (**Figura 6**).

Figura 6: Fotografias de microscopia de contraste de fase mostrando a morfologia de células da linhagem HeLa 48 horas após a transfecção com siRNA Controle e DOCK11. Escala de 100 μ M.



Para confirmar o sucesso da transfecção de siRNA, foi avaliada a qualidade das amostras de cDNA após a extração de RNA de células transfectadas com siRNA. Para isso, foi feito um PCR para GAPDH e posterior eletroforese e, gel de agarose (**Figura 7**). As nítidas bandas de amostras no gel demonstraram a qualidade das amostras, confirmando o sucesso dos protocolos de extração de RNA e transcrição

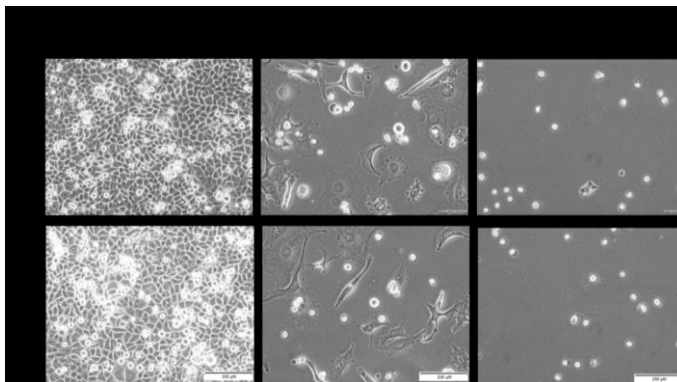
reversa para os subseqüentes experimentos de fechamento de ferida *in vitro* e ensaio de migração.

Figura 7: Eletroforese em gel de Agarose 2% para o controle da qualidade das amostras da extração de RNA, mostrando bandas de expressão de GAPDH em células da linhagem HeLa transfectadas com siRNA controle e DOCK11, e HeLa sem transfecção (WT).



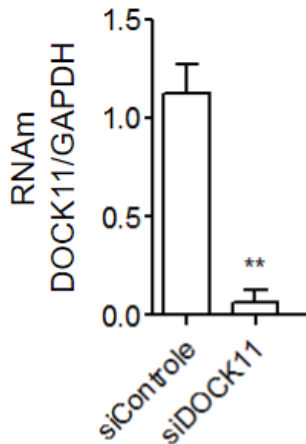
Para padronizar a concentração de Mitomicina C, foram testadas as concentrações 10 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, além de dois tipos de meio DMEM, com e sem suplementação de 10% de SFB, para observar possível interferência. Tendo isso em vista, a padronização demonstrou que a melhor concentração para a inibição da proliferação é de 10 $\mu\text{g/ml}$. A presença ou ausência de suplementação de 10% de SFB, no meio de cultura durante as duas horas de incubação com Mitomicina C, apresentou resultados semelhantes, (**Figura 8**).

Figura 7 (na verdade 8): Fotografias da padronização da concentração do inibidor de proliferação celular, Mitomicina C. Escala de 200 μm .



Visando confirmar a diminuição da expressão de DOCK11 com o protocolo de transfecção de siRNA, foi feito PCR em tempo real para RNAm de DOCK11 e GAPDH e dados normalizados para GAPDH. Como observado na Figura 9, a concentração de RNAm de DOCK11 foi significativamente menor no grupo transfectado com siDOCK11, contrastando com a concentração das células tratadas com siControle, com valor de $P = 0,0093$ (**Figura 9**). Desta forma, a validação do protocolo de transfecção de siRNA como método de diminuição da expressão do gene alvo DOCK11 foi confirmada.

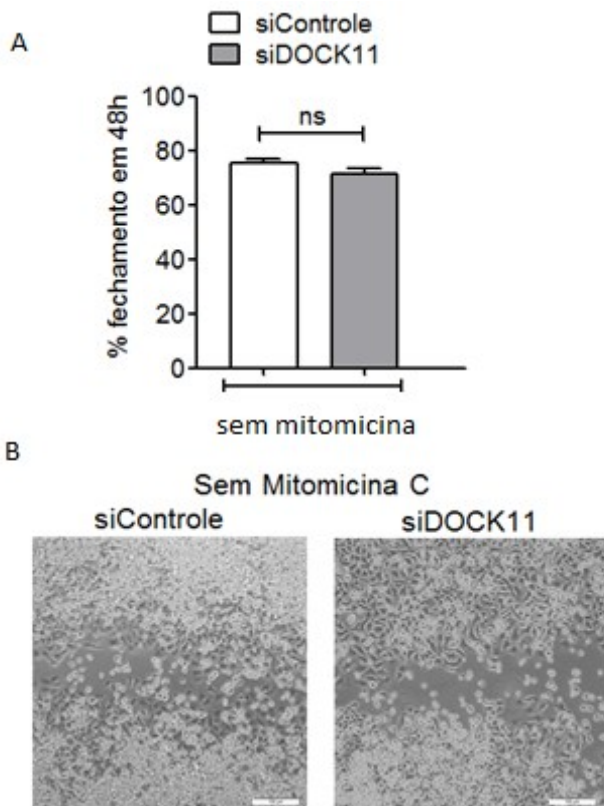
Figura 9: Quantidade de RNAm de DOCK11 em células da linhagem HeLa transfectadas com siRNA Controle e DOCK11. N amostral de 6 em duplicata técnica. $P < 0,01$.



3.2 MIGRAÇÃO RANDÔMICA DE HeLa APÓS TRANSFEÇÃO DE siRNA

Para analisar simultaneamente a migração e a proliferação celular, o experimento de fechamento de ferida *in vitro* foi realizado. A porcentagem de migração 48h após o risco na placa de 3,5 cm de diâmetro foi comparada entre um grupo com diminuição da expressão de DOCK11 (siDOCK11) e grupo controle (siControle) ambos sem inibição de proliferação. O gráfico nos mostra que não houve diferença significativa de porcentagem de fechamento da ferida *in vitro* entre os dois grupos. Isso demonstrou a falta de influência de DOCK11 na migração randômica e na proliferação celular que ocorrem no fechamento de ferida *in vitro* (**Figura 10**).

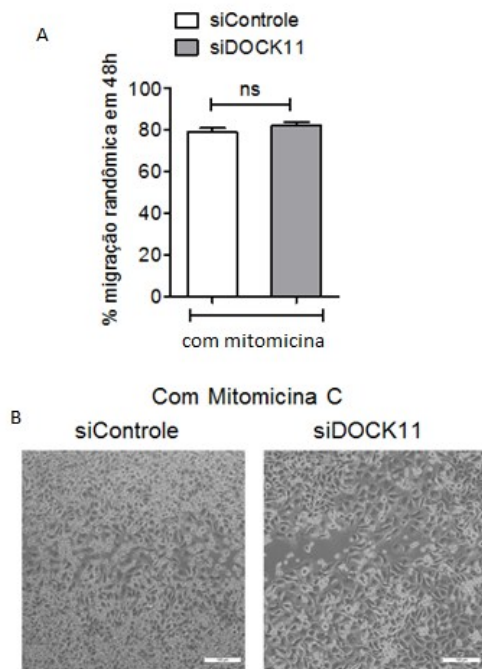
Figura 10: Gráfico da porcentagem de fechamento da ferida *in vitro* em 48 horas após a transfecção de siRNA DOCK11 e Controle. Fotos representativas de cada coluna em escala de 100 μm . N amostral de 3 experimentos independentes em triplicata. $P = 0,1023$.



Para analisar isoladamente a migração celular randômica manipulando a expressão de DOCK11, o ensaio de migração com inibição da proliferação foi realizado. A porcentagem de migração 48h após o risco na placa de 3,5 cm de diâmetro foi comparada entre um grupo com diminuição

da expressão de DOCK11 (siDOCK11) e outro grupo controle (siControle), ambos com inibição da proliferação através da utilização de Mitomicina C. O gráfico mostra que não há nenhuma diferença significativa de porcentagem de migração randômica em 48h entre os dois grupos. Isso demonstrou que DOCK11 não é necessário para a realização de migração randômica (**Figura 11**).

Figura 11: Gráfico da porcentagem do ensaio de migração em 48 horas após a transfecção de siRNA e com inibidor de proliferação Mitomicina C. Fotos representativas de cada coluna em escala de 100 μm . N amostral de 3 experimentos independentes em triplicata. $P = 0,2586$.



3.3 EXPRESSÃO DE DOCK11 EM TUMORES DE MAMA INVASIVOS E METASTÁTICOS

Para comparar a modulação da expressão de DOCK11 em tumores que apresentaram metástase com tumores sem metástase e com tecido saudável, foi feita a análise da expressão do RNA mensageiro de DOCK11 em 109 amostras de câncer de mama e 50 de tecido normal (**Figura 12**), assim como em 89 amostras de carcinoma ductal de mama e 70 de tecido saudável (**Figura 13**), ambos os conjuntos de dados prontamente disponibilizados por “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003). A quantificação da expressão de DOCK11 foi apresentada pela plataforma em escala logarítmica. As duas análises nos mostram que a expressão de DOCK11 está maior naqueles pacientes que tiveram tumores metastáticos se comparados com o grupo que não teve metástase, assim como com o tecido saudável. A modulação da expressão de DOCK11 nos grupos saudável e tumoral sem metástase foi semelhante entre si em ambas as análises, além de se encontrarem mais próximas de zero (**Figuras 12 e 13**).

Figura 12: Gráfico da plataforma Oncomine mostrando a expressão de DOCK11 nos dados de “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003) comparando tecido saudável com câncer de mama sem metástase, e tumoral com metástase. Razão da expressão centrada na mediana em \log^2 , limiar de $p < 0,0001$. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de pacientes em cada um.

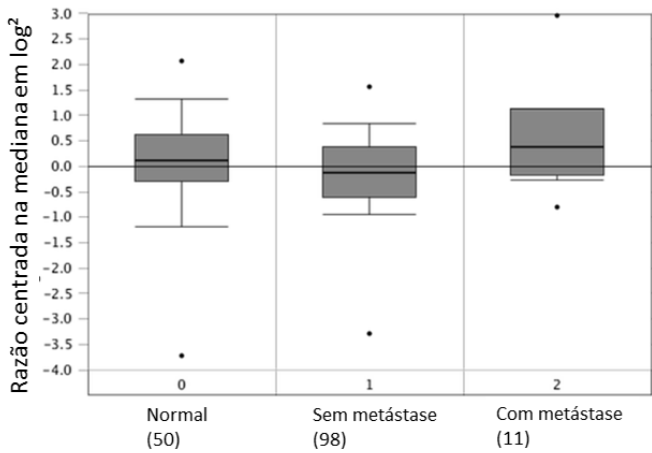
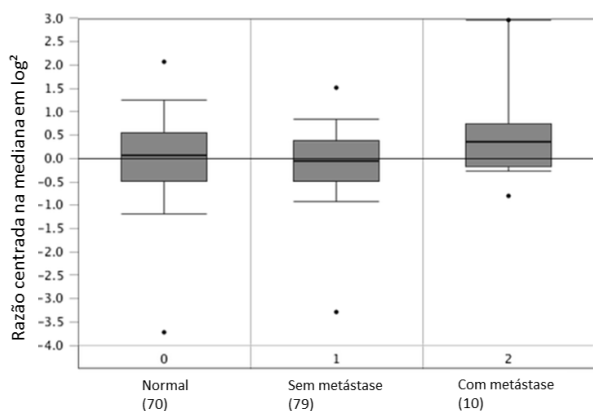


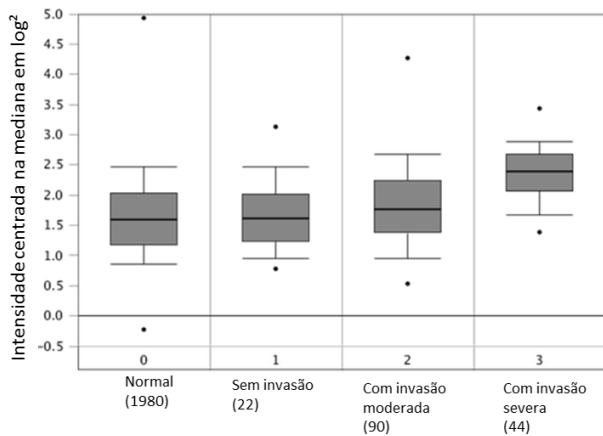
Figura 13: Gráfico da plataforma Oncomine mostrando a expressão de DOCK11 em carcinoma ductal de mama em “Sorlie Breast 2” (SORLIE et al., 2003), comparando tecido saudável com tumoral sem metástase, e tumoral com metástase. Razão da expressão centrada na mediana em \log^2 , limiar de $p < 0,001$. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de pacientes em cada um.



Além de avaliar a presença ou ausência de metástase, foi investigado também o grau de invasão linfática dos tumores disponíveis para análise na plataforma, pois diz respeito à invasão tumoral de tecidos, que tem relação com metástase e migração de células tumorais. Sendo assim, foi feita a análise da expressão de DOCK11 em 2136 pacientes dos dados de “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012), comparando os grupos de tecido saudável com 1980 amostras, tecido tumoral sem invasão linfática com 22 amostras, e os graus de invasão linfática moderada e severa, com 90 e 44 amostras respectivamente. As classificações de grau de invasão linfática em moderada e severa são de acordo com a plataforma Oncomine. No gráfico percebe-se um aumento da expressão de DOCK11 nos tumores que apresentaram invasão

linfática severa (**Figura 14**), contrastando com menor expressão de DOCK11 nos outros grupos. Além disso, é possível observar que a expressão de DOCK11 é semelhante entre o tecido saudável, em tumores que não apresentaram nenhuma invasão linfática e os que tiveram somente uma invasão linfática moderada.

Figura 14: Gráfico da plataforma Oncomine mostrando a expressão de DOCK11 em “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012), comparando tecido saudável com tumoral sem invasão linfática, com invasão linfática moderada e com invasão linfática severa. Intensidade da expressão centrada na mediana em \log^2 , limiar de $p < 0,0001$. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de pacientes em cada um.

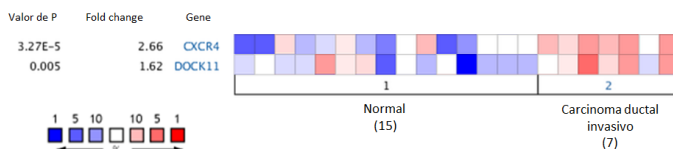


3.4 EXPRESSÃO DE CXCR4 É ACOMPANHADA PELA EXPRESSÃO DE DOCK11 EM TUMORES DE MAMA

Considerando a hipótese levantada de um eixo SDF-1/CXCR4/ DOCK11, investigou-se a modulação da expressão de DOCK11 e de CXCR4 concomitantemente. A diferença de

cor das células nas análises indica a maior (em vermelho) ou menor (em azul) expressão do gene analisado. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene analisado se encontra na lista dos 1%, 5% ou 10% dos genes mais modulados daquela amostra. Considerando isso, foi analisada a expressão pareada de CXCR4 e de DOCK11 em 22 amostras de carcinoma ductal invasivo de mama e tecido saudável de “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007). Como observável na figura, o padrão de alta expressão de CXCR4 é seguido pelo padrão de alta expressão de DOCK11 nas amostras tumorais, evidenciado pelo maior número de células avermelhadas naquele grupo (**Figura 15**). Da mesma forma, em tecido normal há um padrão de baixa expressão para ambos os genes, por causa do maior número de células azuis.

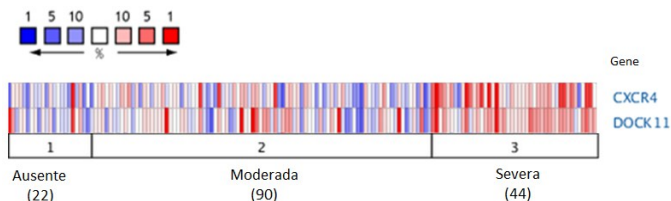
Figura 15: Imagem da plataforma Oncomine mostrando a expressão de CXCR4 e DOCK11 em carcinoma ductal invasivo de mama e tecido normal em “Karnoub Breast” (KARNOUB et al., 2007). A diferença de cor das células indica a maior ou menor expressão do gene, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene se encontra na lista dos 1%, 5% ou 10% genes mais modulados. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de amostras.



Uma análise pareada da expressão de CXCR4 e DOCK11 também foi realizada considerando o grau de invasão linfática observada nos pacientes, em 156 amostras de tumores dos dados de “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012).

Observa-se na figura que o padrão de alta expressão de CXCR4 é acompanhado pelo padrão de alta expressão de DOCK11 nos tumores que apresentaram invasão linfática severa, considerando o maior número de células vermelhas (**Figura 16**). Em contraste, esse padrão de alta expressão de ambos os genes não é visto nos pacientes que não apresentaram nenhuma invasão linfática nem naqueles que obtiveram uma invasão moderada, visto a presença de mais células azuis.

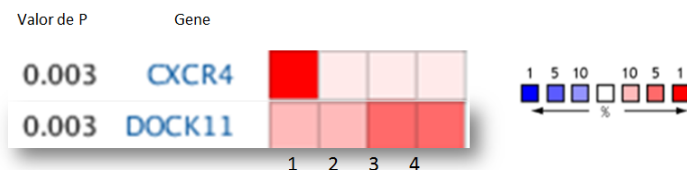
Figura 16: Imagem da plataforma Oncomine mostrando a expressão de CXCR4 e DOCK11 em tumores de “Curtis Breast” (CURTIS et al., 2012) agrupados pelo grau de invasão linfática (ausente, moderada ou intensa). A diferença de cor das células indica a maior ou menor expressão do gene, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene se encontra na lista dos 1%, 5% ou 10% genes mais modulados. Valores abaixo de cada grupo indicam o número de amostras.



A fim de comparar a expressão de CXCR4 e de DOCK11 em vários estudos diferentes, foi elaborada uma análise simultânea dos dados de “Karnoub Breast”, “Radvanyi et al” e “Zhao et al” (KARNOUB et al., 2007; RADVANYI et al., 2005; ZHAO et al., 2004). Os tipos de câncer de mama de cada estudo foram: carcinoma estromal ductal invasivo de mama (KARNOUB et al., 2007),

carcinoma ductal invasivo de mama *in situ* (RADVANYI et al., 2005), carcinoma ductal invasivo de mama (ZHAO et al., 2004) e carcinoma lobular de mama (ZHAO et al., 2004). Da mesma forma que nas figuras anteriores é possível de se observar a maior modulação da expressão de CXCR4 e de DOCK11 nas amostras tumorais e nos pacientes com invasão linfática (**Figuras 15 e 16**), nesta análise também fica evidente um padrão de alta expressão de CXCR4 sendo acompanhado pela maior expressão de DOCK11, em virtude de todas as células de todos os diferentes estudos estarem vermelhas (**Figura 17**).

Figura 17: Imagem da plataforma Oncomine mostrando a expressão de CXCR4 e DOCK11 em quatro estudos diferentes comparando entre tecido normal e cancerígeno, dos tipos 1) estroma de carcinoma ductal invasivo de mama (KARNOUB et al., 2007), 2) carcinoma ductal invasivo de mama *in situ* (RADVANYI et al., 2005), 3) carcinoma ductal invasivo de mama (ZHAO et al., 2004) e 4) carcinoma lobular de mama (ZHAO et al., 2004). A diferença de cor das células indica a maior ou menor expressão do gene, se em tons de vermelho ou azul, respectivamente. A maior, média ou menor intensidade da cor indica que o gene se encontra na lista dos top 1%, 5% ou 10% dos genes modulados. Valores abaixo de cada coluna indicam o número do estudo.



4 DISCUSSÃO

4.1 INFLUÊNCIA DE DOCK11 NA MIGRAÇÃO CELULAR RANDÔMICA

Compreender as contribuições das Pequenas Proteínas G da superfamília Rho na migração celular é importante para entendermos melhor o processo metastático através de um ponto de vista molecular, a fim de estarmos mais próximos da elaboração de tratamentos específicos e eficazes contra metástase. O auxílio de GEFs para a ativação de Pequenas Proteínas G é fundamental para que as mesmas possam participar de processos de modulação do citoesqueleto, como a migração celular, sempre presente em processos metastáticos (GADEA E BLANGY, 2014; GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014; TEICHER E FRICKER, 2010; ROSSMAN, DER, SONDEK, 2005). O GEF DOCK11 foi foco deste trabalho justamente para investigar mais a fundo o seu papel em um contexto de migração celular *in vitro* e expandir esses conhecimentos com análises de dados clínicos relacionados à metástase.

A participação de GEFs da família DOCK em processos de motilidade celular foram descritas anteriormente (GADEA E BLANGY, 2014; GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014). O fator DOCK11 foi alvo de estudos desse trabalho por causa de evidências da sua importância na quimiotaxia para SDF-1, em experimentos de migração utilizando células tumorais HeLa (DILLENBURG-PILLA et al., 2017). Considerando que somente migração direcional foi testada nessa pesquisa anterior, é importante avaliar a capacidade de migração randômica de células tumorais que tiveram a diminuição da expressão de DOCK11. Nesse presente estudo, os experimentos de fechamento de ferida *in vitro* e ensaio de migração com transfecção de siRNA colaboraram para concluir que DOCK11 não é essencial para a migração randômica: no experimento dessa pesquisa não foram utilizados quimioatrativos, permitindo demonstrar a

capacidade de migração randômica, ou seja, sem direcionamento induzido por fatores. Através de PCR em tempo real, foi possível confirmar que as células utilizadas nos experimentos de migração apresentavam menor expressão de DOCK11. Além disso, os testes de controle de qualidade de amostra da extração de RNA, de morfologia celular pós transfecção de siRNA e de padronização de concentração de Mitomicina C mostraram que o resultado encontrado no ensaio de migração randômica não foi influenciado pela proliferação ou dano celular por alta dose de Mitomicina.

A presença de um quimioatrativo, como por exemplo, o SDF-1, é fundamental para induzir e direcionar a migração de células que dispõem de seu receptor, no caso CXCR4. Sem o quimioatrativo, o receptor não é ativado e a indução à migração direcional não acontece (ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; PETRIE, DOYLE, YAMADA, 2009). Os dois experimentos de migração feitos foram importantes para averiguar o papel de DOCK11 tanto na capacidade de fechamento de ferida *in vitro*, onde migração e proliferação acontecem juntas, quanto na migração randômica de forma isolada. Em um primeiro momento, nenhuma diferença significativa foi encontrada sobre a capacidade de fechamento da ferida entre os grupos com ou sem a diminuição da expressão de DOCK11. Ao analisar isoladamente a migração randômica utilizando inibidor de proliferação, também não houve diferença significativa na porcentagem de migração entre os grupos com ou sem diminuição da expressão de DOCK11. Assim pode-se supor que DOCK11 não é importante para a proliferação celular nem para a migração randômica de células tumorais HeLa *in vitro*. A disponibilidade ou ausência de DOCK11 no maquinário celular para a migração randômica acontecer foi indiferente para a célula, o que propõe que DOCK11 não é essencial para a migração randômica.

Portanto, considerando os dados não publicados do mesmo grupo dessa pesquisa sobre a importância de DOCK11 em quimiotaxia (DILLENBURG-PILLA et al, 2007) e o

resultado desse trabalho mostrando a falta de diferença significativa na migração randômica entre os grupos com modulação da expressão de DOCK11, podemos concluir que o fator DOCK11 é dispensável para a migração randômica, mas possivelmente necessário para a quimiotaxia induzida por SDF-1. Isso propõe que células em migração direcional precisam expressar DOCK11 para realizar a quimiotaxia para SDF-1, mas para migrar aleatoriamente o fator não é essencial. Essa observação da necessidade de DOCK11 em quimiotaxia e indiferença em migração randômica possibilita esclarecer um pouco mais o seu papel na motilidade e sinalização celular, considerando que há evidências de outros GEFs participando de migração celular, mas pouca elucidação de DOCK11 (GADEA E BLANGY, 2014; GOICOECHEA, AWADIA, GARCIA-MATA, 2014). Além disso, sabendo que migração celular é um processo fundamental para a ocorrência de metástases, descobertas a respeito dos fatores envolvidos são importantes para elucidar a sinalização celular desses eventos (FRIEDL E WOLF, 2003; FRIEDL E BRÖCKER, 2000). Em adição, experimentos de quimiotaxia à base de imagem (do inglês, “*Image Based Migration Assay*”) seriam interessantes para corroborar essas descobertas, utilizando SDF-1 como quimioatrativo e com transfecção de siDOCK11 para diminuir sua expressão.

4.2 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DOCK11 EM TUMORES

Partindo do princípio de que há dados na literatura indicando a modulação da expressão de fatores DOCK em tumores diversos, juntamente com os primeiros resultados de migração de células tumorais HeLa obtidos nesse trabalho, investigou-se a modulação da expressão de DOCK11 em tumores de pacientes (DILLENBURG-PILLA et al., 2017; YU et al., 2015; GADEA E BLANGY, 2014; SANZ-MORENO et al., 2008; NISHIKIMI et al., 2005). Analisar a expressão de genes através de uma abordagem de bioinformática permite responder perguntas específicas a

respeito dos padrões de expressão em tumores, complementando e avançando para além dos dados de sequenciamento genético tumoral que já se encontram disponíveis na rede (RHODES, D. R. et al., 2007). Além disso, esse tipo de ferramenta proporciona um potencial translacional à pesquisa, pois possibilita a identificação de subtipos moleculares de câncer, importante para a seleção de novos alvos farmacológicos no tratamento de tumores (RHODES, D. R. et al., 2007). A análise do transcriptoma de tumores de diversos pacientes através de uma abordagem de bioinformática permitiu investigar padrões de expressão de DOCK11 em milhares de amostras de câncer de mama, disponibilizadas em bancos públicos e acessadas gratuitamente pela plataforma Oncomine (RHODES, D. R. et al., 2007). Ao analisar a modulação da expressão de DOCK11 em câncer de mama, destacou-se a maior expressão do fator nos tumores metastáticos e invasivos, de acordo com a classificação da plataforma. É um dado interessante, pois essa observação da maior expressão de DOCK11 em tumores mamários agressivos suporta a hipótese inicial de uma via de sinalização em quimiotaxia entre SDF-1, CXCR4 e DOCK11, levantada no começo desse trabalho em virtude das evidências literárias da modulação da expressão de CXCR4 e SDF-1 em câncer de mama (XU et al., 2015; MUKHERJEE, ZHAO, 2013; ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; YAGI et al., 2011; TEICHER E FRICKER, 2010; MÜLLER et al., 2001). Em contraste, a expressão de DOCK11 em tumores não-metastáticos ou pouco invasivos foi semelhante às amostras de tecido saudável. Isso chama a atenção para uma aparente especificidade mais agressiva da modulação da expressão de DOCK11 em tumores mamários invasivos. O mesmo princípio é observado na relação de CXCR4 em câncer de mama, visto que sua expressão está ligada a tumores metastáticos (DILLENBURG-PILLA et al., 2015; ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; YAGI et al., 2011; TEICHER E FRICKER, 2010; MÜLLER et al., 2001). Dessa forma, suporta-se ainda mais a hipótese do eixo de sinalização

entre SDF-1, CXCR4 e DOCK11, elaborada anteriormente. Visto que a versão gratuita da plataforma Oncomine não permite a exportação de dados e figuras, análises estatísticas específicas não puderam ser feitas nos resultados de bioinformática.

4.3 PADRÃO DE EXPRESSÃO DE DOCK11 E CXCR4

No início desse trabalho, foi levantada a hipótese de que há uma via de sinalização em migração celular tumoral que participam juntos o fator DOCK11 e o receptor CXCR4. Com as análises de bioinformática iniciais, foi possível observar uma aparente especificidade da modulação de DOCK11 em câncer de mama metastático e invasivo. Sabendo das evidências literárias sobre a expressão de CXCR4 relacionada com tumores mamários metastáticos, foram realizadas análises de expressão dos dois genes simultaneamente no Oncomine em câncer de mama (DILLENBURG-PILLA et al, 2015; XU et al., 2015; MUKHERJEE, ZHAO, 2013; ZLOTNIK, BURKHARDT, HOMEY, 2011; YAGI et al., 2011; TEICHER E FRICKER, 2010; MÜLLER et al., 2001). Análises de coexpressão em bioinformática possibilitam identificar padrões de expressão compartilhados entre genes (RHODES, D. R. et al., 2007). Segundo os criadores da plataforma Oncomine, vários estudos demonstraram que padrões de coexpressão geralmente indicam função compartilhada (RHODES, D. R. et al., 2007). No caso dessa pesquisa, buscamos indicações de compartilhamento de via de sinalização entre CXCR4 e DOCK11. As análises de coexpressão realmente apresentaram o padrão de alta expressão de CXCR4 sendo acompanhado pela alta expressão de DOCK11. Esse padrão conjugado foi obtido primeiramente em análises independentes que compilavam amostras de cânceres de mama invasivos provenientes de dois estudos diferentes, Curtis *et al* (2012) e Karnoub *et al* (2007).

Segundo os autores do Oncomine 3.0, Rhodes, D. R. et al em 2007, uma abordagem de múltiplas análises permite comparar a informação proveniente de diferentes estudos simultaneamente de forma que é possível refinar os resultados obtidos com análises individuais, proporcionando conclusões mais robustas e consistentes. Com isso em vista, foi feita a busca no Oncomine pelo padrão de coexpressão de CXCR4 e DOCK11 em quatro grupos de dados distintos, que disponibilizam amostras tumorais dos tipos carcinoma estromal ductal invasivo de mama (KARNOUB et al., 2007), carcinoma ductal invasivo de mama *in situ* (RADVANYI et al., 2005), carcinoma ductal invasivo de mama (ZHAO et al., 2004) e carcinoma lobular de mama (ZHAO et al., 2004). Da mesma maneira que foi observada a coexpressão dos genes nas análises individuais anteriores, essa análise múltipla da plataforma mostrou um padrão de alta expressão de CXCR4 sendo acompanhada pela alta expressão de DOCK11 nos quatro grupos de dados avaliados. Com isso, destacou-se e enriqueceu o resultado obtido nas primeiras figuras independentes. O pareamento do padrão de expressão entre CXCR4 e DOCK11 foi fortalecido não só por avaliar um maior N amostral, mas também pelas amostras serem obtidas de pacientes do mundo todo, portando prováveis perfis genéticos bem diversificados. Os dados provenientes da contribuição de um grande número de estudos diferentes facilitam a pesquisa que busca padrões de modulação da expressão de fatores variados (RHODES, D. R. et al., 2007).

Poder observar uma grande correlação no padrão de expressão entre um receptor conhecido na literatura e um fator pouco elucidado traz respaldo para a importância de persistirem estudos a respeito de DOCK11 em câncer de mama. Os padrões de alta expressão e a possível especificidade tumoral de DOCK11 encontradas em análises de bioinformática são observações importantes, pois é conhecido o potencial das ferramentas de bioinformática para identificar subtipos moleculares de câncer e consequentemente novos alvos terapêuticos (RHODES, D. R.

et al., 2007). A descoberta de novos alvos farmacológicos seria benéfica para o tratamento de câncer de mama triplo-negativo, pois são dificilmente tratáveis ao passo que suas células não possuem receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e proteína HER2, principais alvos farmacológicos de terapias hormonais alvo-específicas como Tamoxifeno para ER+ e Herceptina/Trastuzumab para HER2+ (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017; WANG et al, 2015; FIGUEIROA-MAGALHÃES et al, 2015; LIU et al, 2014; HACKSHAW et al, 2011). Mesmo com fármacos disponíveis, as vezes os tratamentos podem criar resistência e recorrência do tumor nas pacientes (CLARKE et al, 2015; MARTINEZ-OUTSCHOORN, et al, 2011; LANGE E YEE, 2008). Dessa forma, quanto mais resultados confirmem as observações feitas nesse trabalho sobre a especificidade de DOCK11, maior é o potencial translacional de elaboração de novos fármacos contra tumores mamários invasivos e que apresentem alta expressão de CXCR4. Por isso, é interessante confirmar os resultados encontrados nesse estudo, assim como direcionar os estudos para metodologias e abordagens moleculares para esclarecimento da via de sinalização, além de testar *in vitro* a migração em células tumorais mamárias manipulando a expressão de DOCK11 e CXCR4.

4.4 CONCLUSÃO

Com essa pesquisa, pode-se concluir que a expressão de DOCK11 não é necessária para a migração randômica de células tumorais HeLa, como visto no experimento de fechamento de ferida *in vitro*, o qual mostrou nenhuma diferença significativa de migração entre os grupos transfectados para o silenciamento de DOCK11. Esses resultados seriam mais robustos se células não-transfectadas também tivessem sido avaliadas como grupo controle. Através da abordagem de bioinformática, também foi possível concluir que a modulação da expressão de DOCK11 está mais acentuada em cânceres de mama metastáticos e invasivos.

Além disso, a análise múltipla realizada na plataforma Oncomine mostrou que a alta expressão de DOCK11 acompanha o mesmo padrão de alta expressão do receptor CXCR4 em cânceres de mama invasivos, o que sugere a existência de um eixo de sinalização que inclua tanto o fator GEF quanto o receptor.

5 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos poderá ser selecionada uma (ou mais) linhagem(ns) metastática(s) de câncer de mama que expresse(m) CXCR4 e possua(m) alta expressão de DOCK11, para testar o papel migratório desse GEF em tumores mamários. Dessa maneira poderá ser verificado se os mesmos resultados deste trabalho, de padrões de migração e expressão *in vitro* e bioinformática, em células tumorais HeLa e em tumores de pacientes, poderão ser vistos em linhagens de câncer de mama. Essa abordagem permitirá um esclarecimento do papel de DOCK11 na sua especificidade em tumores mamários, assim como um potencial translacional para o tratamento de câncer de mama positivo para CXCR4 e DOCK11 e triplo-negativo para ER, PR e HER2. Não obstante, é essencial que se investigue a via de sinalização DOCK11/CXCR4 completa para elucidar as diretas relações entre a maior expressão desse fator com a capacidade de invasão e metástase em câncer de mama induzida por CXCR4.

REFERÊNCIAS

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–572, ago. 2002.

CLARKE, R.; TYSON, J. J.; DIXON, J. M. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418 Pt 3, n. 0 3, p. 220–34, 15 dez. 2015.

COOK, D. R.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. **Oncogene**, v. 33, n. 31, p. 4021–35, 31 jul. 2014.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346–52, 18 abr. 2012.

DAR, A. et al. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. **Leukemia**, v. 25, n. 8, p. 1286–96, ago. 2011.

DILLENBURG-PILLA, P. et al. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis *via* a CXCR4/G α i/mTORC1 axis. **The FASEB Journal**. v. 29, p. 1056– 1068. 2015.

DILLENBURG-PILLA, P.; HANSEL, A. F. F.; TRENTIN, A.; GUTKIND, J. S. Identificação de novos ativadores de pequenas proteínas G (GEFs) da família Rho envolvidas na quimiotaxia mediada por EGF. **Manuscrito em preparação**. 2017.

ECKHARDT, B. L. et al. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 6, p. 479–497, 1 jun. 2012.

FIDLER, I. J. The organ microenvironment and cancer metastasis. **Differentiation**, v. 70, n. 9–10, p. 498–505, dez. 2002.

FIDLER, I. J. Timeline: The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, jun. 2003.

FIDLER, I. J.; KRIPKE, M. L. The challenge of targeting metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 34, n. 4, p. 635–41, dez. 2015.

FIGUEROA-MAGALHÃES, M. C. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast**, v. 23, n. 2, p. 128–36, abr. 2014.

FRIEDL, P.; BRÖCKER, E.-B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 1, p. 41–64, 1 jan. 2000.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–374, maio 2003.

GADEA, G.; BLANGY, A. Dock-family exchange factors in cell migration and disease. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 10-12, p. 466–477, 2014.

GOICOECHEA, S. M.; AWADIA, S.; GARCIA-MATA, R. I’m coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell

migration. **Cell Adhesion and Migration**, v. 8, n. 6, p. 535–549, 2014.

HACKSHAW, A. et al. Long-term benefits of 5 years of tamoxifen: 10-year follow-up of a large randomized trial in women at least 50 years of age with early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 13, p. 1657–63, 1 maio 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp>. Acesso em: 06 agosto 2017.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 247–69, 2005.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews, Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–52, abr. 2009.

KARNOUB, A. E. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 557–563, 4 out. 2007.

LANGE, C. A.; YEE, D. Progesterone and breast cancer. **Women's Health**, v. 4, n. 2, p. 151–162, mar. 2008.

LAURIN, M.; CÔTÉ, J.-F. Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. **Genes & Development**, v. 28, n. 6, p. 533–47, 15 mar. 2014.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of

cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 1 fev. 2007.

LIU, C.-Y. et al. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 431, 17 set. 2014.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E. et al. Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 10, p. 924–938, 15 nov. 2011.

MUKHERJEE, D.; ZHAO, J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. **American Journal of Cancer Research**, v. 3, n. 1, p. 46–57, 2013.

MÜLLER, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50–56, 1 mar. 2001.

NAGY, J. A.; DVORAK, H. F. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 29, n. 7, p. 657–62, out. 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What is Cancer? Disponível em <www.cancer.gov>. Acesso em 06 agosto 2017.

NISHIKIMI, A. et al. Zizimin2: A novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. **FEBS Letters**, v. 579, n. 5, p. 1039–1046, 2005.

PETRIE, R. J.; DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 8, p. 538–49, ago. 2009.

RADVANYI, L. et al. The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11005–10, 2 ago. 2005.

RHODES, D. R. et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. **Neoplasia**, v. 9, n. 2, p. 166–80, fev. 2007.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. **Trends in Cell Biology**, v.16, n.10, p. 522-9. 2006.

ROSSMAN, K. L.; DER, C. J.; SONDEK, J. GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 167–180, 2005.

SANZ-MORENO, V. et al. Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. **Cell**, v. 135, n. 3, p. 510–523, 2008.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418–23, 8 jul. 2003.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Res**, v. 70, n. 14, p. 5649–69, 2010.

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 11, p. 2927–2931, 2010.

WANG, Y. et al. CDK7-Dependent Transcriptional Addiction in Triple-Negative Breast Cancer. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 174–186, set. 2015.

WHEELER, D. L.; DUNN, E. F.; HARARI, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. **Nature Reviews, Clinical Oncology**, v. 7, n. 9, p. 493–507, set. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 27 maio 2017.

XU, C. et al. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4953–64, 2015.

YAGI, H. et al). A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. **Science Signaling**, v. 4, n. 191, p. ra60, 2011.

YU, J. R. et al. TGF- β /smad signaling through DOCK4 facilitates lung adenocarcinoma metastasis. **Genes and Development**, v. 29, n. 3, p. 250–261, 2015.

ZHAO, H. et al. Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 6, p. 2523–36, jun. 2004.

ZLOTNIK, A.; BURKHARDT, A. M.; HOMEY, B.
Homeostatic chemokine receptors and organ-specific
metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p.
597–606, 25 ago. 2011.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. The chemokine superfamily
revisited. **Immunity**, v. 36, n. 5, p. 705–16, 25 maio 2012.